

Pferdeklinik der Universität Zürich

(Direktor Prof. Dr. med. vet. J. Auer)

Arbeit unter der Leitung von Dr. med. M. Egermann

**Auswirkungen einer intrazerebralen Applikation von Leptin auf die mechanischen
Eigenschaften des Knochens beim Schaf**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

Vetsuisse Fakultät Universität Zürich

Vorgelegt von

Susanne Christina Tröster

Tierärztin von Hirschau, Deutschland

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. J. Auer, Referent

Prof. Dr. sc. techn. E. Schneider, Korreferent

Zürich 2007

Zusammenfassung	1
Zusammenfassung in Englisch	3
1. Einleitung	5
1.1 Osteoporose	6
1.2 Tiermodelle für Osteoporose	13
1.3 Leptin	19
2. Ziel der Studie	22
3. Material und Methoden	22
3.1 Studiendesign	22
3.2 Versuchstiere	24
3.3 Operationen	24
3.3.1 Anästhesie.....	24
3.3.2 Ovariectomie	25
3.3.3 Implantation einer Kanüle in den 3. Ventrikel	26
3.3.4 Implantation einer Kanüle in den lateralen Ventrikel	31
3.4 Leptinapplikation und Applikation von artifiziellm CSF	32
3.5 Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA) Messungen	34
3.6 Euthanasie, Präparation und Entnahme von Knochenbiopsien	35
3.7 Knochendichtemessung mittels Computertomographie	35
3.7.1 Distale Tibia.....	36
3.7.2 L6	36
3.8 Mechanische Testung	7
3.8.1 Kompressionstest von Wirbelkörperbiopsien.....	37
3.8.1.1 Spongiosaprogenentnahme	37
3.8.1.2 Kompressionstest der Spongiosaprogen	37

3.8.2 Vier-Punkt-Biegung der Tibia	38
3.8.3 Torsionstest der Tibia (Steifigkeit, Festigkeit)	39
3.9 Statistik	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Verlaufsbeobachtungen und Ausfallraten	41
4.2 Körpergewicht	41
4.3 Knochendichte	42
4.3.1 DEXA Messungen	42
4.3.1.1 Knochendichte im Verlauf.....	42
4.3.2 periphere quantitative Computertomographie	44
4.3.2.1 L6.....	44
4.3.2.2 Tibiae	45
4.4 Mechanische Testung	46
4.4.1 Kompressionstest von Wirbelkörperbiopsien.....	46
4.4.1.1 Steifigkeit.....	46
4.4.1.2 Drucklast.....	49
4.4.2 Vier-Punkt-Biegung der Tibia	48
4.4.2.1 Steifigkeit in anterior-posterior	48
4.4.2.2 Steifigkeit in lateral-medial.....	49
4.4.3 Torsionstest der Tibia.....	50
4.4.3.1 Torsionssteifigkeit der Tibiae	50
4.4.3.3 max. Moment der Tibiae.....	51
4.5 Korrelationen	52
5. Diskussion	55
6. Literaturverzeichnis	60
7. Abkürzungsverzeichnis	71

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	72
9. Danksagung	74
10. Lebenslauf	75

Zusammenfassung

Hintergrund: Neben seinen Auswirkungen auf den Energiehaushalt und die Fertilität beeinflusst Leptin den Knochenstoffwechsel und damit die Knochendichte. Leptindefiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Knochendichte und die intra-zerebrale Injektion von Leptin hemmt über einen hypothalamischen Regelkreis die Knochenbildung und kann somit die Knochendichte reduzieren. Demografische Veränderungen in westlichen Ländern führen zu einer zunehmenden Bedeutung von Osteoporose und assoziierten Frakturen. Für die Evaluation neuer Therapiemethoden besteht ein großer Bedarf an Tiermodellen für Osteoporose und das Schaf bietet sich aufgrund der Körpergröße und Haltungsbedingungen als Großtiermodell an, wobei gewisse Einschränkungen durch das Verdauungssystem als Wiederkäuer vorliegen.

Die vorliegende Studie untersucht die Auswirkungen einer intra-zerebralen Injektion von Leptin auf die Dichte und biomechanischen Eigenschaften des Knochens bei Schafen. Sie soll zeigen, ob die Resultate bei Mäusen dupliziert werden können.

Methoden: Die Studie wurde mit 26 Schafen der Rasse Corriedale in Werribee, Australien, über einen Zeitraum von maximal 25 Wochen durchgeführt. Dafür wurden die Schafe in folgende 5 Gruppen aufgeteilt:

1. Kontrollgruppe (n=10),
2. Gruppe, in der das Leptin in den lateralen Ventrikel appliziert wurde (n=3),
3. Gruppe, in der das Leptin in den 3. Ventrikel appliziert wurde (n=2),
4. Zusätzliche Gruppe, in der das Leptin modifiziert in den lateralen Ventrikel appliziert wurde (n=5),
5. Gruppe, in der artifizielles CSF appliziert wurde (n=6).

Bei allen Schafen in den Behandlungsgruppen 2.-5. wurde eine Ovariectomie durchgeführt. Die Applikation von Leptin erfolgte über einen chirurgisch implantierten Katheter im dritten bzw. lateralen Ventrikel. Während des Versuchs wurde bei den Schafen in regelmässigen Abständen das Körpergewicht gemessen und anhand DEXA Messungen die Knochenmineraldichte bestimmt.

Nach Euthanasie wurden die Knochen (Tibia, L6) zur Analyse der Knochenstruktur mittels pQCT und Bestimmung der biomechanischen Eigenschaften mit Hilfe von

biomechanischen Tests (Kompressionstest, 4-Punkt-Biegung und Torsionstest) entnommen.

Resultate: Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Gruppen hinsichtlich der Knochendichte im Lendenwirbel 6 und der Tibia. Auch die Ergebnisse der biomechanischen Testung, Kompressionstest der L6, 4 Punkt Biegung und Torsionstest der Tibiae, zeigen keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Interpretation: Mit der gewählten Methode der Leptininjektion konnte keine signifikante Abnahme der Knochendichte oder der mechanischen Eigenschaften erreicht werden. Die intra-ventrikuläre Applikation von Leptin ist zusammen mit einer Ovariectomie nicht in der Lage, bei Schafen Osteoporose zu induzieren. Die Reduktion der Knochendichte nach intra-cerebraler Leptingabe bei Mäusen kann somit nicht auf das Schaf übertragen werden.

Zusammenfassung in Englisch

Background: Besides its effects on energy intake, energy expenditure and fertility, leptin also influences bone metabolism and therefore bone mineral density. Leptin-deficient mice show increased bone mineral density and the intracerebral injection of leptin inhibits, through a hypothalamic control circuit, bone remodelling and can therefore reduce bone mineral density. Demographic changes in western populations have lead to an increased importance of osteoporosis and associated fractures. To evaluate new therapy models animal models for osteoporosis are in big demand. Due to its body size and husbandry the sheep may appear to be a suitable large animal model. The gastrointestinal system as ruminants may question the feasibility of this species.

The present study evaluates the effects of intracerebral injection of leptin on bone density and the biomechanical characteristics in sheep. The goal is to find out whether the results achieved in mice can be duplicated in sheep.

Methods: The study was carried out over a period of 25 weeks with 26 Corriedale sheep in Werribee, Australia. The sheep were divided into the 5 following groups:

1. control group (n=10)
2. group that had leptin injected into the lateral ventricle (n=3)
3. group that had leptin injected into the 3rd ventricle (n=3)
4. additional group that had leptin injected in a modified way into the lateral ventricle (n=5)
5. group that had artificial CSF injected (n=6)

All sheep in group 2-5 were ovariectomized. Leptin was injected through a surgically implanted catheter into either the third or lateral ventricle. During the study body weight and bone mineral density measurements (DEXA measurements) were conducted on a regular basis.

After euthanasia specific bones (Tibia, L6) were collected to analyse bone structure (using a pQCT) and to determine the biomechanical characteristics with biomechanical tests (compression test, 4-point-flexion and torsion test).

Results: No significant differences within the five groups were found regarding bone mineral density in L6 and the tibia. The results of the biomechanical testing, compression test of L6, 4-point-bending - and torsion test of the tibiae, did not show any significant differences within the 5 groups.

Conclusions: Using this method of leptin application no significant decrease in bone mineral density or change in mechanical characteristics could be detected. The intraventricular application of leptin in combination with ovariectomy does not induce osteoporosis in sheep. The decrease of bone mineral density after intracerebral application of leptin in mice can therefore not be transferred to sheep.

1. Einleitung

Osteoporose wird definiert als eine Erkrankung des Skeletts, die durch verminderte Knochenstärke gekennzeichnet ist und somit prädisponierend ist für einen Anstieg des Frakturrisikos.(1) Epidemiologische Studien sagen eine Verdoppelung der älteren Population (>50 Jahre) für die nächsten 30 Jahre voraus. Dies wird auch zu einer Zunahme der Prävalenz der Osteoporose beitragen.(2,3,4) Osteoporose führt zu einem Anstieg des Frakturrisikos verbunden mit einer Verzögerung der Frakturheilung.(5-9) Die Behandlung dieser Frakturen ist bis heute ein unbefriedigend gelöstes Problem. Die Verwendung von konventionellen Implantaten für die Fixation des osteoporotischen Knochens ist limitiert und Misserfolge treten infolge der schwachen Knochenstruktur häufig auf.(3,5,6)

Weltweit durchgeführte Studien (7-9) haben das Ziel, neue Frakturfixationssysteme zu entwickeln, die speziell für osteoporotischen Knochen geeignet sind. Vor der Anwendung von neuen Behandlungsmöglichkeiten in der Klinik sind jedoch *in-vivo* Tests der Implantate erforderlich. Um Konzepte für die Behandlung von Osteoporose assoziierten Frakturen und der Osteoporose selbst zu entwickeln, beurteilen und zu verbessern, besteht deshalb ein grosser Bedarf für ein Tiermodell, das die Situation von osteoporotischem Knochen in menschenähnlichen Dimensionen aufzeigt.(10)

Zur Osteoporoseforschung wurden bereits eine Vielzahl von Tiermodellen entwickelt, die Hunde, Katzen, Kaninchen, Nagetiere, Schweine und Primaten verwenden.(11) Osteoporose kommt physiologisch nur beim Menschen und bei Primaten vor. Der Knochenverlust beim Tier muss daher durch verschiedene Methoden, z.B. Ovariectomie, Ovariohysterektomie, Glukokortikoide, kalziumarme und Vitamin D-arme Diät, phosphatreiche Diät und Immobilisation, induziert werden. Obwohl veröffentlichte Strategien (12-14) zu einer signifikanten Reduktion der Knochenmasse führen, stimmen sie doch nicht genau mit der osteoporotischen Situation beim Menschen überein. Bei der Induktion der Osteoporose durch Glukokortikoideinsatz sind diese Methoden zusätzlich mit einer hohen Ausfallrate und Nebenwirkungen verbunden. In mehreren Studien wurde auch das Schaf als Modell untersucht.(11,13-20)

Das Wissen, das mit dem hier diskutierten Projekt gewonnen wird, wird zur Entwicklung eines dringend benötigten Tiermodells für Osteoporose beitragen. Grundlage des Modells ist eine Vergleichbarkeit mit der des Menschen sowohl im

Knochenstoffwechsel als auch in Grösse und Aufbau des Skeletts. Gleichzeitig wird erhofft, dass diese Studie zum Verständnis des Ursprungs der Osteoporose und zur Vergrösserung des grundlegenden Wissens der Knochenbiologie beitragen wird.

1.1 Osteoporose

Laut dem Deutschen Grünen Kreuz stellt die Osteoporose die häufigste Stoffwechselerkrankung des Knochens dar. Nach Definition der WHO leiden ca. 30% aller postmenopausalen Frauen in den USA und in Europa an Osteoporose.(21) Exakte epidemiologische Untersuchungen für Deutschland und die Schweiz liegen nicht vor. Schätzungen gehen derzeit von 2 bis 10 Mio. betroffenen Patient(inn)en aus, davon ca. 3 Mio. mit manifesten Frakturen. Die für die Osteoporose aufzuwendenden Kosten werden in den Vereinigten Staaten derzeit auf ca. 14 Mrd. Dollar pro Jahr und in Deutschland allein für Frakturen des Femur auf ca. 2 bis 4 Mrd. Euro geschätzt. Bis zum Jahr 2050 soll die Zahl der Femurfrakturen nach aktuellen epidemiologischen Berechnungen weltweit auf über 6 Millionen jährlich ansteigen, was Versorgungskosten von ca. 130 Mrd. US Dollar nach sich ziehen würde.(23,24) Nach statistischen Erhebungen werden in der Europäischen Gemeinschaft 30 - 40 % der 50- jährigen Frauen im Verlauf ihres restlichen Lebens eine mit Osteoporose assoziierte Fraktur erleiden.(24,25) Eine von drei Frauen wird nach der Menopause eine Wirbelkörperkompressionsfraktur erleiden, eine von sechs Frauen im Alter von bis zu 65 Jahren eine Hüftfraktur.(26) Bei 13 % der Männer besteht im Verlauf des Lebens das Risiko einer osteoporoseassoziierten Fraktur.(21,24,27) In vielen Ländern wurde bereits in den letzten 40 - 50 Jahren ein signifikanter Anstieg in der alterskorrigierten Inzidenz osteoporosebedingter Frakturen beobachtet. Eine der wichtigsten Ursachen dieser Frakturen ist neben dem auslösenden Trauma bzw. Sturz die Reduktion der Knochenmasse und -dichte sowie strukturelle Veränderungen, welche zu einer Beeinträchtigung der mechanischen Kompetenz des Skelettsystems im Alter führen.(23) Definition der Osteoporose auf Basis der Knochendichte:(28)

Normal:

Ein Wert der Knochenmineraldichte (BMD = Bone Mineral Density) oder des Knochenmineralgehalts (BMC = Bone Mineral Content) innerhalb 1 Standardabweichung vom Mittelwert junger erwachsener Personen.

Osteopenie:

Ein BMD- oder BMC-Wert zwischen -1 und $-2,5$ Standardabweichungen unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen.

Osteoporose:

Ein BMD- oder BMC-Wert von $-2,5$ oder mehr unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen.

Schwere Osteoporose (manifeste Osteoporose):

Ein BMD- oder BMC-Wert von mehr als $2,5$ unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen und das Vorhandensein von einer oder mehrerer Frakturen.

Beim Menschen treten zwei Formen der Osteoporose auf:

Die primäre Osteoporose stellt mit etwa 95 % die häufigste Form dar. Bei diesem Krankheitsbild sind keine exogenen Ursachen für den Knochenabbau bekannt. Die primäre Osteoporose wird in Typ I und Typ II differenziert.

Der Typ I - auch postmenopausale Osteoporose genannt - findet sich speziell bei Frauen durch den Hormonverlust in der Menopause und tritt im Verhältnis zur Osteoporose beim Mann mit einer Häufigkeit von 6:1 auf. Patienten im Alter zwischen 50 und 70 Jahren sind zu 5 – 10 % betroffen. Durch den hauptsächlich trabekulären Knochenverlust treten Frakturen vorwiegend an den Stellen auf, wo dieser biomechanisch relevant ist.(29) Frakturgefährdet sind somit vor allem der untere Brustwirbel- bzw. der obere Lendenwirbelbereich, der Femurhals sowie der distale Radius.

Der Typ II der primären Osteoporose wird auch senile Osteoporose genannt. Nach dem 70. Lebensjahr leiden 90 – 95 % der Osteoporosepatienten an dieser Form der Krankheit, wobei Frauen doppelt so häufig wie Männer betroffen sind. Bei der senilen Osteoporose ist im Gegensatz zur postmenopausalen Osteoporose nicht überwiegend der trabekuläre Knochen betroffen, sondern zusätzlich auch der kortikale Knochen. Schenkelhals, Wirbelkörper und der Radius sind für Frakturen prädestiniert.(30,31) Vitamin D3-Mangel kann Auslöser dieses Typs sein, da durch diesen Mangel eine Resistenz der β -Hydroxylase ausgelöst wird, welche die Umwandlung in das aktive Vitamin D3 erschwert. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines sekundären

Hyperparathyreoidismus mit Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut und damit zu einer Entmineralisierung der Knochen.

Die sekundäre Osteoporose tritt als Begleiterscheinung einer anderen Krankheit auf. Häufige Auslöser der sekundären Osteoporose sind beispielsweise Morbus Cushing, Hyperthyreose, Hypogonadismus, das Malabsorptionssyndrom und in Folge einer Therapie mit Heparin und Kortikoiden.(32)

Osteoporotische Knochenfrakturen stellen ein schwerwiegendes Gesundheitsproblem in allen Regionen und Populationen der Welt dar. Sie führen zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität und bestimmen massgeblich die Morbidität und auch Mortalität älterer Menschen.(33,34) Osteoporosebedingte Frakturen zeichnen sich durch zum Teil multifrakturierte und/ oder eingestauchte Frakturmuster bei reduzierter Qualität der Knochen aus. Infolge der Immobilisierung treten bei den meist alten Patienten Folgekrankheiten wie die pulmonale Dekompensation, die Thrombembolie, die Ausbildung von Decubiti und weitere skelettale Störungen auf.

Um die Osteoporose verstehen zu können, ist es wichtig, die Regulation des Knochenumbaus und speziell die der Knochenbildung zu verstehen.(35,36) Der Knochen ist das einzige Organ, das einen Zelltyp - die Osteoklasten - enthält, dessen einzige Funktion es ist, laufend das Organ, das es beherbergt, zu zerstören. Diese Zerstörung oder Resorption des Knochens geschieht während des gesamten Lebens und ist in gesunden Individuen ausbalanciert durch Neuentstehung und Abbau von Knochen, ein Prozess, der „bone remodelling“ genannt wird. Die Knochenmasse wird zwischen dem Ende der Pubertät und der Menopause auf einem konstanten Niveau gehalten. Bone remodelling ist der Prozess, der durch Osteoporose beeinflusst wird, eine Krankheit, die auf zellulärer Ebene dadurch charakterisiert ist, dass es zu einem relativen Anstieg der Knochenresorption im Vergleich zur Knochenneubildung kommt (Abb.1).(37)

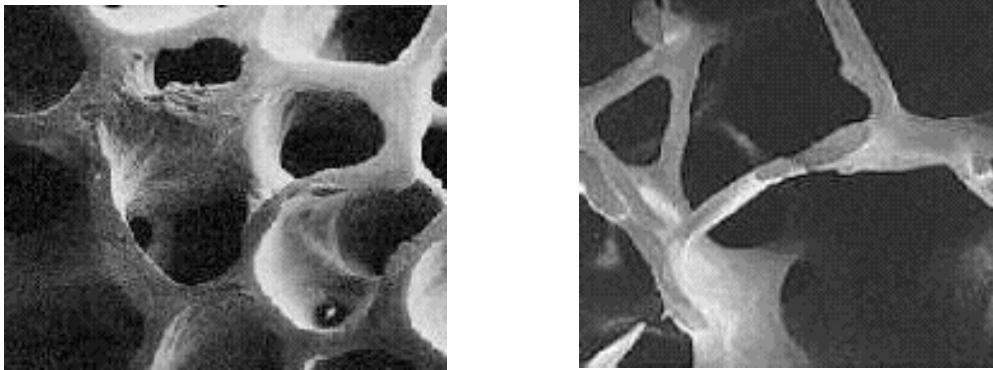


Abb1. Normaler Knochen (links) im Vergleich zu osteoporotischem Knochen (rechts) (Quelle: National Osteoporosis Foundation www.nof.org)

Etwa mit Beginn des 25. Lebensjahres beginnt ein physiologischer Knochenabbau, der pro Jahr 0,5 - 1 % beträgt. Die Verluste während des gesamten Lebens können bei Frauen 30 – 40 % der maximalen Knochenmasse und bei Männern 20 – 30 % betragen.(38) Neben der Knochenmasse ist auch die Struktur des Knochens als Risikodeterminante für Frakturen von entscheidender Bedeutung. Zu den prädisponierenden Faktoren für osteoporoseassoziierte Veränderungen zählen die Akkumulation von Materialermüdungserscheinungen, die Ausbildung von mangelhaften trabekulären Verbindungen und der Anstieg der Absterberate der Osteozyten mit zunehmendem Alter.(39,40) Das Alter selbst ist der stärkste Risikofaktor für osteoporotische Frakturen. Das Osteoporoserisiko selbst wird durch eine Reihe von hormonellen und weiteren Umwelteinflüssen erhöht. Diese Faktoren können jedoch nur einen geringen Anteil des Gesamtrisikos für osteoporotische Frakturen erklären.(41)

Die chemische Zusammensetzung des Knochens ist bei Osteoporose im Vergleich zum gesunden Knochen unverändert, das trabekuläre Netzwerk dagegen ist pathologisch verändert (Abb. 1).

Der Knochenschwund zeigt sich besonders deutlich nach der Menopause. Der postmenopausale Verlust betrifft hauptsächlich den trabekulären Knochen und wird durch Mangel an Östrogenen verursacht (30), da der trabekuläre Knochen schneller auf metabolische Veränderungen anspricht als der kortikale Knochen.(29,43) Die Gründe, warum es nach der Menopause bei der Frau zur Beschleunigung des Knochenstoffwechsels und des Knochenverlustes kommt, sind noch nicht vollständig geklärt. Die Skelettmasse der Frau korreliert mit der Gesamtzeit der

Östrogenexposition. Eine frühe Menopause - operativ (Ovariectomie) oder nicht-operativ (Klimax praecox) bedingt - beschleunigt das Entstehen von Osteoporose. Östrogenmangelzustände bei prämenopausalen Frauen, ausgelöst z.B. durch Anorexia nervosa oder durch übermässigen Sport, induzieren Knochenabbau und können zu einer Verminderung der maximalen Knochenmasse führen.(31)

Eriksen et al. (44) fanden zahlreiche Sexualhormonrezeptoren, die auf Osteoblasten angesiedelt sind. Es ist wahrscheinlich, dass Östrogene einen direkten Effekt auf den Knochen besitzen.(38) Der Knochenverlust ist unter Östrogenmangel in der Frühphase durch einen stark gesteigerten Knochenumsatz (high turnover) gekennzeichnet. Infolge verminderter oder fehlender Apoptose der Osteoklasten kommt es zu erhöhter Abbauaktivität und somit überwiegt der Knochenabbau den Aufbau.(44,45) Die physikalischen Eigenschaften des Knochens werden durch die Knochendichte, Grösse und Geometrie, die Mikroarchitektur und die chemische Zusammensetzung beeinflusst.

Der Verlust von Knochenmasse im höheren Alter beruht hauptsächlich auf einer verminderten Aktivität der Osteoblasten und damit der Knochenneubildung und betrifft sowohl den trabekulären als auch den kortikalen Knochen.(30) Der Umbau des kortikalen Knochens geschieht am Endost. Ein Ungleichgewicht zwischen Knochenformation und Knochenresorption führt mit zunehmendem Alter zu einer gesteigerten Trabekularisierung der inneren Oberfläche des kortikalen Knochens und einer Aufweitung des Markraumes.

Für die Entstehung der Osteoporose macht R.D. Wasnich (42) fünf Risikofaktoren verantwortlich: Das Alter, die genetische Veranlagung, Umwelteinflüsse, hormonelle (Östrogen- und Androgenmangel) und chronische Krankheiten (Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, Malabsorptionssyndrom und Gastrektomie) sowie physikalische Eigenschaften des Knochens. Andere Autoren machen auch den Lebensstil (Rauchen, Alkoholkonsum), Bewegungsmangel und Kalziummangelernährung für das Auftreten von Osteoporose verantwortlich.(31) Nach Battmann et al. werden drei Hypothesen für die Entwicklung von osteoporotischen Knochen geprüft.(46) Danach ist die generalisierte Zellalterung, die zunehmende Abnahme der hormonellen Stimulierung der Knochenformation im Alter und das geringe Ansprechen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren als Grund für die Entwicklung des osteoporotischen Knochens zu sehen.

Vitamin D-Mangel kann das Frakturrisiko bei älteren Frauen erhöhen.(47) Ausgelöst wird der Mangel durch eine reduzierte Vitamin D-Aufnahme über die Nahrung und eine verminderte Vitamin D-Aktivierung in der Haut. Die verringerte Eigensynthese von Vitamin D (primärer Vitamin D Mangel) beruht zum einen auf einer geringeren Sonnenexposition im Alter und zum anderen darauf, dass die Haut älterer Menschen weniger Cholecalciferol produzieren kann.(48,49) Andere Risiken liegen in einer hohen Phosphat- und Proteinzufuhr. So kann eine hohe Phosphatzufuhr zu einer Hemmung der 1,25 Dihydroxy-Vitamin D3-Synthese in der Niere führen und die Knochenresorption verstärken.(50)

In Untersuchungen wurde festgestellt, dass es bezüglich des Auftretens von Osteoporose geographische und ethnische Unterschiede gibt.(51) Das grösste Osteoporoserisiko tragen dünne, zierliche, kaukasische und asiatische Frauen, vor allem wenn in deren Familienanamnese (genetische Prädisposition) diese Erkrankung bereits bekannt ist. Es gibt Hinweise, dass genetische Faktoren wichtige Determinanten der maximalen Knochenmasse sind. Die Inzidenz osteoporotischer Frakturen ist unter Weissen und Asiaten am höchsten und in der schwarzen Bevölkerung am niedrigsten.(51) Weiterhin ist die Frakturinzidenz in der städtischen Bevölkerung wesentlich höher als in der ländlichen Bevölkerung. Verantwortlich dafür kann geringere körperliche Betätigung oder unterschiedliche Ernährung sein.(52)

In der Folge sind die wichtigsten Risikofaktoren, die beim Menschen Osteoporose verursachen oder zur Osteoporose beitragen, zusammengefasst (38):

Bewegung: Geringe körperliche Aktivität, langfristige Bettruhe, Paraplegie, Hemiplegie, Raumfahrt.

Ernährung: Lebenslange geringe Kalziumzufuhr, phosphat-, protein- und faserreiche Kost.

Genussmittel: Chronisch hoher Alkoholkonsum, Zigarettenrauchen, Koffein.

Genetik: Weisse oder asiatische Rassen, familiäre Osteoporosehäufung.

Endokrine Erkrankungen: Hypogonadismus, Cushing-Syndrom, Hyperthyreose, primärer Hyperparathyreoidismus, Hyperprolaktinämie, Akromegalie, idiopathische Hyperkalzurie, Diabetes mellitus.

Medikamente: Kortikoide, Heparin, Thyroxinüberdosierung, Laxantien, Antikonvulsiva, Lithium, GnRHAnaloga.

Gastroenterologische Erkrankungen: Magenresektion, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Pankreasinsuffizienz, Leberzirrhosen.

Sonstige Erkrankungen: Niereninsuffizienz, Asthma bronchiale, chronische Polyarthritis und andere entzündlich-immunologischen Systemerkrankungen.

Durch die ständige Entwicklung der Computertechnik und die Entwicklungen im Feld der bildgebenden Verfahren ist es heute möglich, schon geringe Veränderungen der Knochenmasse relativ früh zu diagnostizieren. Durch die Einschätzung der Veränderungen der Knochenmasse kann auch das Stadium der Osteoporose eingeschätzt werden. Dazu werden mit Hilfe der volumenbezogenen quantitativen Computertomographie (QCT) und der flächenbezogenen dualen Röntgenabsorptiometrie (DEXA) an den Knochen der Extremitäten und der Wirbelsäule Knochendichtemessungen vorgenommen. Osteoporose wird gegenwärtig durch Anamnese, körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen einschliesslich der Bestimmung von Knochenmarkern, radiologischer Untersuchung durch Röntgendiagnostik sowie Knochendichtemessungen diagnostiziert.

Immer wichtiger wird dabei die Methodik der Knochendichtemessung, da sie den Vorteil der Nicht-Invasivität besitzt. Die Knochenmasse verhält sich meist gegenläufig zum Frakturrisiko, Knochenmassebestimmungen eignen sich somit zum Erkennen von Risikogruppen, zum Abschätzen des Frakturrisikos, sowie – wie in dieser Studie vorrangig – zur Verlaufskontrolle.

Um die Anpassungsvorgänge im osteoporotischen Knochen besser untersuchen zu können, müssen auch die strukturellen Veränderungen berücksichtigt werden.(38,53,54) Die dreidimensionale Struktur von Knochen kann mit Hilfe des Mikro-Computertomographen mit einer hohen Auflösung erfasst werden.(55) Der Verlust an Spongiosa wird durch eine Abnahme in der Anzahl und Dicke der Trabekel und durch eine Abnahme der Verbindungen der Trabekel untereinander dargestellt.(56)

Neben den bildgebenden Techniken hat auch die Laborchemie als Möglichkeit der Beurteilung des Knochenstoffwechsels an Bedeutung gewonnen. Es gibt eine Vielzahl

biochemischer Parameter, die in direktem Zusammenhang mit den Umbauaktivitäten der Knochenmatrix stehen. Diese Parameter werden als Marker für die Aktivität des Knochenstoffwechsels bezeichnet, mit deren Hilfe man Aussagen zur Knochenformation und der Knochenresorption machen kann.(57)

1.2 Tiermodelle für Osteoporose

Die postmenopausale Osteoporose ist ein Gesundheitsproblem von grosser Wichtigkeit und dennoch wird die Pathogenese dieser Krankheit noch nicht ganz verstanden. Osteoporose ist eine progressive Krankheit, für deren Erforschung eine Studie über einen relativ langen Zeitraum, d.h. mehrere Jahre nötig ist, um eine Aussage über die Therapiereaktion treffen zu können. Dieser Zeitfaktor schränkt Studien mit an Osteoporose erkrankten Menschen ein. Man erhält nur langsam Ergebnisse, die Sammlung von Daten ist langwierig und das Bestehen einer konstanten Studiengruppe wird durch natürlichen Verlust, d.h. entweder durch Umzug oder Tod erschwert.

Ein zusätzliches Forschungsziel ist die Entwicklung und Testung von Methoden speziell für die Behandlung osteoporose-assoziiierter Frakturen, z.B. Implantate, Endoprothesen oder Wachstumsfaktoren, die die Osseointegration im osteoporotischen Knochen fördern. Ein geeignetes experimentelles Tiermodell zum Studium der Osteoporose könnte den Fallstrick in Zusammenhang mit dem Studium dieser Krankheit, d.h. den oben erwähnten Zeitfaktor und die Verhaltensunterschiede bei den humanen Testsubjekten ausschliessen. Die Elimination dieser Variablen hängt von der sorgfältigen Auswahl der Tiere und von der Haltung der Tiergruppen ab. Neue experimentelle medikamentöse Therapien und orthopädische Implantate könnten an grossen Tierzahlen getestet werden, wobei ein Kontrollstandard erreicht werden könnte, der bei der humanen Forschung nicht zu erreichen ist.

Osteoporose kommt natürlicherweise nur beim Menschen vor, Ausnahmen sind Einzelberichte von nicht-humanen Primaten in Gefangenschaft.(58,59,60) Die komplexe Interaktion zwischen den Organen bei Osteoporose kann weder in der Zellkultur noch durch andere Ersatzstrategien simuliert werden. In Tiermodellen muss daher Osteoporose induziert werden. Die Anforderungen an Tiermodelle sind vielfältig und abhängig von der jeweiligen Fragestellung. In einer Studie mit Tieren soll stets auf gleiche Rasse, gleiches Alter, selbe Herkunft, vergleichbare Grösse und Gewicht geachtet werden.

Von der nordamerikanischen Food and Drug Administration (US FDA) wurden spezifische Richtlinien für Osteoporosestudien zusammengestellt (61):

- Präklinische Studien müssen erst an ovariectomierten Ratten und danach an einem grossen Tiermodell durchgeführt werden. 1994 wurden der Primat, das Schwein und das Schaf als grosses Tiermodell zugelassen.
- Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen muss gewährleistet sein.
- Genetische, organische und hormonelle Übereinstimmungen müssen als Auswahlkriterien für Tiere überprüft werden.
- Es sollte ausreichendes Hintergrundwissen über biologische Eigenschaften des Tieres vorhanden sein.
- Es muss möglich sein, die tierexperimentellen Studien zu Verallgemeinern.
- Ökologische und ethische Überlegungen sollten in der Studienplanung berücksichtigt werden.(62)

Kalu definiert ein Tiermodell für Osteoporose als ein lebendes Tier, bei dem ein spontaner oder induzierter Knochenverlust aufgrund eines ovariellen Hormonmangels studiert werden kann.(63) Das Tier sollte in der Haltung, Pflege und veterinärmedizinischen Betreuung leicht zu handhaben sein. Wichtig ist die Vergleichbarkeit zwischen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Tiermodells mit denen des Menschen. Als letzten Anspruch fordert er die Vergleichbarkeit anderer mit der zu untersuchenden Krankheit zusammenhängenden Phänomene (Wirkung von Arzneimitteln, Nebeneffekte des Östrogenmangels).

Bis heute wurden vor allem nichthumane Primaten, Hunde, Katzen, Nagetiere, Kaninchen, Meerschweinchen, Schweine und Schafe untersucht. Die meisten der im Anschluss besprochenen Tierarten sind im Gegensatz zum Menschen Quadrupeden. Da biomechanische Kräfte neben den Geschlechtshormonen einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der Knochenmasse ausüben, kann der Östrogenverlust bei Quadrupeden einen anderen Stellenwert haben als bei Bipeden.(64)

Nichthumane Primaten:

Nichthumane Primaten zeigen, wie der Mensch, eine natürliche Abnahme der Knochenmineraldichte im Laufe der Alters.(65) Eine Vielzahl von Publikationen beschreibt die Effekte einer Ovariectomie auf das Skelett von Affen wie zum Beispiel

Paviane und Makaken.(1,66-70) Diese Modelle haben einige Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen:

Ein wichtiger Vorteil ist die Ähnlichkeit des Organsystems mit dem des Menschen (Gastrointestinaltrakt, Hormonsystem und Knochenmetabolismus). Der monatliche Zyklus und das Hormonmuster der weiblichen Makaken sind dem des Menschen sehr ähnlich.(71)

Nach Ovariectomie nichthumaner Primaten fanden Miller et al. eine signifikante Reduktion des Knochenvolumens und eine Verminderung des spongiösen Knochens in Wirbelkörpern.(72)

Weibliche Rhesusaffen, die mit einem Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten behandelt wurden, zeigten eine verminderte Knochendichte, die in ihrem Ausmass vergleichbar ist mit der Abnahme bei postmenopausalen Frauen.(73)

Die Primaten erreichen mit vier bis sieben Jahren die höchstmögliche Knochenmasse (peak bone mass), was für die Wirksamkeit der Ovariectomie in Bezug auf die Knochendichteveränderung von Bedeutung ist.(74) Mit höherem Alter der Tiere wirkt sich deren zunehmende Aggressivität für das Handling nachteilig aus. Als ein weiterer Nachteil ist aufzuführen, dass ihre Anschaffung teuer ist und an die Unterbringung und das betreuende Personal hohe Anforderungen gestellt werden. Das Zoonoserisiko für das Personal ist ein weiterer kritischer Problempunkt.

Die geringe verfügbare Tierzahl und die negative Einstellung der Öffentlichkeit sprechen gegen die Verwendung des Primaten als Versuchstiere für die Fragestellung der Osteoporoseinduktion.

Hunde:

Ein bedeutender Vorteil in der Verwendung des Hundes als Tiermodell besteht in der grossen Ähnlichkeit der Knochenumbauprozesse im kortikalen und spongiösen Knochen mit denen des Menschen.(75) Östrogenmangel ist eine Ursache für Knochenschwund und die Tatsache, dass Hunde ein Haversisches System des kortikalen Knochens besitzen, spricht für die Verwendung in Studien der Osteoporoseforschung.(76-79) Im Umgang sind Hunde im Vergleich zum Primaten einfacher zu handhaben und auch kostengünstiger.

Ovulation kommt bei einer Hündin zweimal pro Jahr vor, während Menschen und Affen polyovulatorisch sind. Das bedeutet, dass der Östrogenspiegel beim Hund im Gegensatz

zum Primaten über einen langen Zeitraum im Jahr sehr niedrig ist. Boyce konnte im Gegensatz zu anderen Studien keine signifikante Abnahme der Knochenmasse nach erfolgter Ovariectomie feststellen.(75-79) Auch werden nach Ovariohysterektomie, welche bei Hunden häufig durchgeführt wird keine Spontanfrakturen beschrieben. Dies lässt den Schluss zu, dass der Östrogenspiegel des Hundes eine untergeordnete Rolle im Bezug auf den Knochenstoffwechsel hat.

Ein zusätzlicher Faktor, der gegen die Verwendung des Hundes als Versuchstier spricht, ist die ethische Einstellung zu diesem Versuchstier als „des Menschen bester Freund“.

Ratten:

Die Verwendung der Ratte als Versuchstier birgt Vorteile: Ratten sind kostengünstig, einfach zu handhaben und als Versuchstiere allgemein akzeptiert.

Es gibt umfangreiche Literatur über die ovariectomierte Ratte in Bezug auf histomorphologische Veränderungen, biochemische Marker, Methoden zur Knochendichtemessung und Evaluation der Brüchigkeit von Knochen.(5,6,63,80-85) Auch gibt es ausreichendes Wissen über Stoffwechseleffekte und Diäteeffekte bei Ratten. Die Abnahme des kortikalen Durchmessers bei der alternden Ratte ist dokumentiert.(63,83) Nagetiere haben keine natürliche Menopause, durch die Ovariectomie wird eine artefizielle Menopause ausgelöst.(85)

Diese Gründe führten unter anderem dazu, dass die ovariectomierte Ratte das in der Osteoporoseforschung und der Forschung zur Behandlung der Osteoporose am häufigsten verwendete Tiermodell ist.(86)

In der Osteoporoseforschung existieren zwei verschiedene Rattenmodelle: Die drei Monate alte geschlechtsreife Ratte oder die zwölf Monate alte Ratte, die ein abgeschlossenes Knochenwachstum aufweist. Da die Osteoporose eine Erkrankung des adulten Menschen darstellt, ist ein Tiermodell mit einem entsprechend abgeschlossenen Knochenwachstum erforderlich. Andererseits sollte die Ovariectomie nicht so spät erfolgen, dass der Östrogenmangel von alters- und krankheitsbedingten Knochenverlusten überlagert werden könnte.(87) Der Nachteil der älteren, ausgewachsenen Ratten besteht in den höheren Anschaffungskosten, dem Problem der Beschaffung in ausreichender Anzahl und dem zeitintensiven biochemischen oder histologischen Nachweis des Knochenverlusts. Diese Nachteile sind bei den jüngeren,

drei Monate alten Ratten, bei denen sich Effekte einer Ovariectomie bereits nach etwa einem Monat zeigen, nicht vorhanden.

Für die Forschung im Bereich osteoporotischer Frakturen eignet sich das Rattenmodell nicht, da die Grösse des Implantates nicht der Körpergrösse der Ratte angemessen ist. Weiterhin haben Ratten kein Haversisches System im Kortikalen Knochen und zeigen ein dem Menschen nicht vergleichbares Remodelling.(88) Im weiteren ist es schwierig die Resultate bei der Ratte auf den Menschen zu übertragen.

Schweine:

Das Minipig weist im Gegensatz zu anderen Tiermodellen einige spezifische Vorteile auf. Das Schwein hat - ähnlich der Frau - einen polyöstrischen, polysaisonalen Zyklus. Die Zykluslänge beträgt zwischen 18 und 21 Tagen. Des Weiteren ist das gastrointestinale System dieser Omnivoren dem des Menschen ähnlich.

Minipigs eignen sich aufgrund ihrer ausreichenden Grösse und der einfachen Haltung für Untersuchungen mit Osteosynthesematerialien und prothetischen Versorgungen. Der Knochenstoffwechsel (inkl. trabekulärer und kortikaler Umbauprozesse) und auch die Knochenstruktur sind dem des Menschen ähnlich. Mehrfache Blut- und Knochenbiopsieentnahmen werden von den Tieren relativ gut toleriert.

Moskilde et al. fanden einen deutlichen Verlust der Knochendichte an der Wirbelsäule bei ovariectomierten Schweinen, ähnlich dem Verlust der Knochendichte einer Frau in der Postmenopause.(89) Während eines Zeitraums von sechs Monaten zwischen Ovariectomie und der Knochendichtebestimmung wurden Sinclair S- 1 Minipigs mit einer kalziumreduzierten Diät gefüttert. Bei dem Versuch mit diesen Schweinen zeigten sich signifikante Änderungen in den Knochenumbauparametern (Zunahme der resorptiven Vorgänge), die zu signifikanten Veränderungen der Knochenstruktur führten (Perforation der Trabekelplatten). Es kam zu einem Abfall der Knochenmasse und der biomechanischen Stabilität des spongiösen Knochens der Wirbelkörper.(90)

Diese Ergebnisse lassen Minipigs als gutes Modell auch im Hinblick auf operative Verfahren erscheinen.

Die Nachteile im Gebrauch des Schweins als Tiermodell für die Osteoporoserecherche liegen in der Lärmbelastung und der möglichen Aggressivität der Tiere untereinander. Letzteres kann durch verbesserte Haltungssysteme und -bedingungen allerdings signifikant verringert werden.

Schafe:

Günstig wirkt sich bei dem Umgang mit Schafen aus, dass sie in der Herde gehalten werden können, zahm sind und der emotionale Bezug der Bevölkerung, ähnlich wie beim Schwein, nicht derselbe wie bei Heimtieren ist.

Das Schaf ist ein saisonal polyöstrisches Tier mit unterschiedlichem Zyklus je nach Rasse, Tageslänge oder Lichtbedingungen im Stall, d.h. die Zykluslänge kann zwischen 14 und 21 Tagen variieren. Ein ovariectomisiertes Schaf mit häufigeren Zyklen reagiert empfindlicher auf Östrogenmangel als zum Beispiel der Hund.

Aufgrund der ausreichenden Grösse des Schafes können chirurgische Interventionen stattfinden. Neue orthopädische Implantate können an einer grossen Anzahl von vergleichbaren Tieren kontrolliert eingebracht werden. Die Entnahme von Blut, Urin sowie Knochenbiopsien ist einfach durchzuführen. Diese Möglichkeiten erleichtern Untersuchungen auf klinischer, histologischer, zellulärer und biochemischer Ebene.

Chavassieux zeigte, dass durch Ovariectomie eine kontinuierliche Abnahme der Knochenneubildung während 10 Wochen bis sechs Monaten nach dem Eingriff zu verzeichnen war.(15)

Die Abnahme des Knochenvolumens mit zunehmendem Alter sowie eine signifikante Reduktion der Knochenmasse nach Ovariectomie lässt das Schaf als gutes Modell für Studien der Altersosteoporose sowie für Studien der Östrogenmangelosteoporose erscheinen.(90)

Das Studiendesign orientiert sich an den von der FDA 1994 verabschiedeten Richtlinien zur Verwendung von Tiermodellen in der Osteoporoseforschung.

Ein Vergleich zwischen allen existierenden Tiermodellen, die humane Osteoporose simulieren, zeigt, dass das Schaf am besten die Qualifikation betreffend Hormonstatus, Bone remodelling, Körpergewicht und Knochenstruktur erfüllt.(91) Durch die Ovariectomie wird ein Knochenmasseverlust von ca. 10% induziert, der aber im Vergleich zur humanen Osteoporose viel niedriger ist. Daher ist die Ovariectomie zur Induktion einer Osteoporose beim Schaf nicht ausreichend.

Das Osteoporosemodell beim Schaf, bei dem Ovariectomie zusammen mit der medikamentösen Behandlung mit Steroiden, Calcium-reduzierter Diät and begrenzter Bewegung kombiniert wird, führte zu einer Verringerung der Knochenmassedichte um 30%.(92) Wegen der hohen Ausfallrate und den vielen Nebeneffekten und Neben-

wirkungen ist dieses Modell ethisch fraglich. Zusätzlich simuliert dieses Modell eine Mischung aus postmenopausaler und glucocortikoid-induzierter Osteoporose, die nicht mit der häufig vorkommenden postmenopausalen Osteoporose verglichen werden kann.

1.3 Leptin

Der Knochenumbau ist ein physiologischer Prozess bei Wirbeltieren, um eine konstante Knochenmasse zwischen dem Ende der Pubertät und dem Versagen der Keimdrüsen zu gewährleisten. Neben der gut beschriebenen lokalen Regulation des Knochenumbaus gibt es auch eine zentrale Kontrolle der Knochenmasse.(35,79,81,93-99) Diese zentrale Kontrolle schliesst Leptin ein, ein Hormon, das von Adipozyten sezerniert wird und Körpergewicht, Fortpflanzung und Knochenumbau kontrolliert, nachdem es an seine Rezeptoren, die sich in den Kernen des Hypothalamus befinden, bindet (Abb. 2).(100) Diese Resultate der Erforschung des Knochenumbaus bei Nagern geht einher mit klinischen Beobachtungen bei Menschen und führt zu neuen Fragestellungen im Bezug auf Knochendichte und Knochenphysiologie.(93)

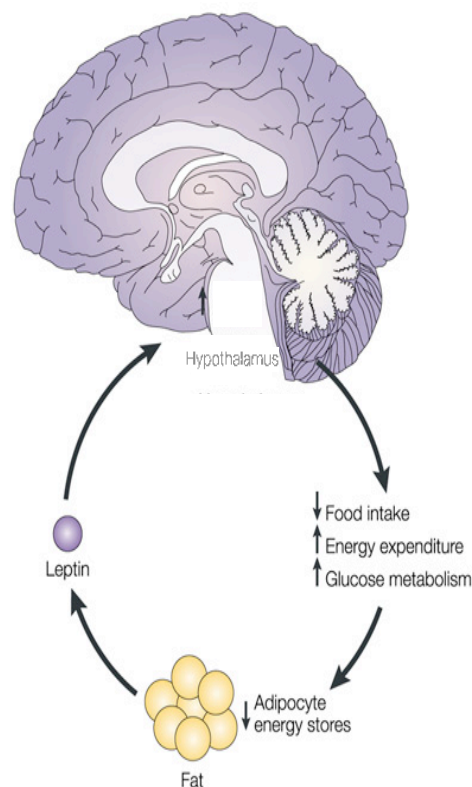


Abb. 2 Einfluss von Leptin auf den Metabolismus, Quelle: R&D Systems 1997 Catalog

Das menschliche Leptin (OB) ist ein 16 kDa, 146 Aminosäure Polypeptid. Die einzige Zelle von der bekannt ist, dass sie Leptin sezerniert, ist der Adipozyt. Anatomische

Regionen, in denen der lösliche OB Rezeptor exprimiert wird sind adipöse Gewebespeicher, der Hypothalamus, das Herz und die Hoden.(101)

Der Haupteinfluss des Leptin liegt in der Regulation des Energiehaushaltes und der Fertilität.(91,101-105) Des Weiteren kontrolliert Leptin die Knochenbildung zentral durch Bindung an seine Rezeptoren in den hypothalamischen Kernen, wo der Leptinrezeptor besonders stark exprimiert ist.(99) Ein Anstieg von Adipozyten führt zu einem Anstieg des Leptinlevels, welches die POMC (pro-opiomelanocortin) und CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) Expression hochreguliert, während es gleichzeitig die AGRP (Agouti-related protein) und NPY (neuropeptide) Expression im Hypothalamus herunterreguliert. Als Folge dieser Regulation wird die Nahrungsaufnahme vermindert und der Energieverbrauch und der Glukosemetabolismus gesteigert, was wiederum zur Reduzierung der Adipozyten-Energiereserven führt.(93)

Bei Untersuchungen der Knochenbildung wird die Funktion des ob-Gens für den Knochenstoffwechsel untersucht. M. Amling (Hamburg) konnte in Zusammenarbeit mit G. Karsenty (Baylor College of Medicine, Texas) und seinem Team zeigen, dass das ob-Gen (Obesity = Übergewicht) nicht nur eine wichtige Position in Bezug auf das Körpergewicht und die Sexualfunktion inne hat, sondern auch eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Knochenmasse spielt.

Es ist schon seit einiger Zeit bekannt, dass das von Fettzellen gebildete Leptin auf den Hypothalamus wirkt. Ziel vorausgehender Untersuchungen war es, die Verbindung zwischen Leptin, Gehirn und Knochen aufzudecken, indem zwei Arten von Mäusen untersucht wurden, die unter genetisch bedingtem Übergewicht leiden. Eine Gruppe der Mäuse war nicht in der Lage Leptin zu bilden (ob/ob-Mäuse), die andere Gruppe konnte Leptin produzieren, jedoch nicht den Leptinrezeptor, der normalerweise im Hypothalamus vorhanden ist (db/db-Mäuse). Beide Mäusestämme waren übergewichtig, aber bereits die Röntgenuntersuchung zeigte zusätzlich ungewöhnlich dichte Knochen. Durch weiterführende Experimente wurde bestätigt, dass der Leptin-Stoffwechselweg intakt sein muss (d.h. sowohl Leptin als auch sein Rezeptor müssen im Gehirn vorhanden sein), damit die Knochenbildung mit einer normalen Geschwindigkeit ablaufen kann. Wenn dieser Regelkreis unterbrochen wurde, entweder durch Fehlen von Leptin oder seines Rezeptors, signalisierte das Gehirn den

knochenbildenden Zellen aktiver zu werden und mehr Knochen zu bilden. Die Knochen in Leptin-defizienten Mäusen erscheinen normal, wenn man Länge und Dicke betrachtet; die Spongiosa hingegen ist ungewöhnlich dicht. Die Knochen sind aber nicht nur dicht, sondern auch genauso stark und flexibel wie normaler Knochen. Diese Situation stellt das genaue Gegenteil der Verhältnisse bei der Osteoporose dar, wo die Knochenspongiosa dünn und schwach ist. Während das Fehlen eines funktionierenden Leptin-Regelkreises zwar vorteilhaft ist, um dichten und stabilen Knochen zu bilden, leiden die Tiere an den Nebeneffekten, d.h. Übergewichtigkeit und Unfruchtbarkeit. Es gibt jedoch Hinweise, dass Leptin auch einen nebenwirkungsfreien, separaten Regelweg steuert, um die Knochenmasse zu kontrollieren: Zum einen gibt es Mäuse, die nur die Hälfte des normal vorhandenen Leptins produzieren und die dann ein normales Gewicht, aber trotzdem dichte Knochen haben; des weiteren gibt es Mäuse, die weder Fett, noch Leptin bilden können, aber ebenfalls sehr dichte Knochen haben ohne jedoch Übergewicht zu entwickeln.

Leptin, das Hormonprodukt des ob-Gens, fungiert demnach als ein Inhibitor der Knochenformation, indem es an das Gehirn signalisiert, die Neubildung von Knochen zu hemmen. Intracerebroventrikuläre (ICV) Infusion von Leptin in den 3. Hirnventrikel von ob/ob Mäusen (Leptin-defiziente Mäuse) führt zu einem Knochenmassenverlust. Diese neuen Erkenntnisse des Knochenstoffwechsels eröffnen neue Möglichkeiten der Osteoporosetherapie und -prävention.

Knochenmasse ist im Wesentlichen das Produkt einer balancierten Funktion von Zellen, die neuen Knochen bilden und Zellen, die alten Knochen abbauen. Osteoporose resultiert aus einem Ungleichgewicht - besonders aus einer vermehrten Knochenresorption - und ist die häufigste Erkrankung des Skelettsystems in der westlichen Welt. Derzeit angewandte Therapien der Osteoporose zielen darauf ab, den Resorptionsprozess zu verlangsamen, aber es ist wenig über die Rolle der Knochenbildung bei der Aufrechterhaltung der Knochenmasse bekannt. Die Identifikation des Leptinstoffwechselweges, in dem das Gehirn eine zentrale Komponente in der Neubildung von Knochen darstellt, eröffnet neue Dimensionen von Therapiekonzepten. Es könnte also in Zukunft möglich sein, den Leptin-Regelweg so zu manipulieren, dass man eine erhöhte Knochenmasse erhält, ohne dabei die unerwünschten Wirkungen auf Gewicht und Fruchtbarkeit zu erzeugen.(106)

2. Ziel der Studie

Bevölkerungsstatistische Studien sagen einen dramatischen Anstieg der älteren Population und eine Zunahme der Osteoporose voraus.(2,3,4) Die Behandlung von Osteoporose und der damit assoziierten Frakturen ist heute immer noch ein nicht ausreichend gelöstes Problem. 20% der Osteoporosepatienten sterben während des ersten Jahres nach einer Fraktur. Die gegenwärtige Entwicklung von neuen Behandlungskonzepten (neue Implantate, die Verwendung von Knochenzement, Einsatz von Growth Factors) sorgen für einen grossen Bedarf nach einem Tiermodell für Osteoporose, um Frakturfixationssysteme zu entwickeln und zu verbessern.

Diese Studie untersucht die Auswirkungen einer intracerebroventrikulären Injektion von Leptin auf die Knochendichte und Biomechanischen Eigenschaften des Knochens beim Schaf. Das längerfristige Ziel ist die Entwicklung eines standardisierten Grosstiermodelles für Osteoporose. Falls die Ergebnisse dieser Studie beweisen, dass, wie schon bei der Maus und Ratte festgestellt, beim Schaf ebenfalls die zentrale Kontrolle der Knochenmasse durch eine Veränderung des Leptinspiegels im Hypothalamus gesteuert wird, könnte dies für die Induktion von Osteoporose bei Tieren verwendet werden. Weiterhin könnte dieser Ansatz auch für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für Osteoporose verwendet werden.

Die Knochendichte wird in-vivo mittels DEXA und anschliessend ex-vivo mittels Computertomografie bestimmt. Die biomechanischen Eigenschaften des Knochens werden anhand von Biege- und Torsionstests analysiert. Die Auswahl der Testverfahren und Knochenproben orientiert sich an vorangegangenen Studien (Referenz Lill).

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

In der vorliegenden Studie wurde die Leptinapplikation verglichen mit einer Injektion von Artifiziellem Liquor (Scheinkontrolle) und unbehandelten Tieren. Weiterhin wurden zwei verschiedene Injektionsverfahren verwendet.

Gruppe 1 (n=10): Kontrollgruppe (Control)

Gruppe 2 (n=3): Leptinapplikation in den lateralen Ventrikel und Ovariectomie (Leptin LV)

Gruppe 3 (n=2): Leptinapplikation in den 3. Ventrikel und Ovariectomie (Leptin 3V),

Gruppe 4 (n=5): Leptinapplikation modifiziert in den lateralen Ventrikel und Ovariectomie (Leptin LVm),

Gruppe 5 (n=6): Applikation von artifiziell CSF und Ovariectomie (CSF).

Die Versuchsdauer betrug bei den Gruppen 1 und 3 12 Wochen, bei den Gruppen 2, 4 und 5 25 Wochen. Ausser bei der Kontrollgruppe wurden alle Schafe ovariectomiert (Tab. 1). Der Einfluss der Leptinapplikation wurde anhand folgender Variablen untersucht: *in-vivo* Knochendichte (Dexa), *ex-vivo* Knochendichte (pQCT), biomechanische Eigenschaften, Histomorphometrie, biochemische Marker in Serum und Urin. Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Knochendichte sowie die biomechanischen Eigenschaften. Die weiteren Analysen wie histologische Untersuchungen und Untersuchungen von Knochenmarkern wurden in den Partnerinstitutionen durchgeführt und sind nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Schafnummer	Gruppe	Zeitdauer (Wochen)
05, 06, 41, 43, 113, 120, 175, 243, 255, 263	(1) Kontrollgruppe (n=10)	25
110, 130, 142	(2) Leptinapplikation in den lateralen Ventrikel, ovx (n=3)	12
38,77	(3) Leptinapplikation in den 3. Ventrikel, ovx (n=2)	25
212, 234, 236, 246, 261	(4) Modifizierte Applikation von Leptin in den lateralen Ventrikel, ovx (n=5)	12
78, 83, 152, 205, 206, 211	(5) Applikation von artifiziell CSF, ovx (n=6)	25

Tab. 1 Einteilung der Schafe in Versuchsgruppen

3.2 Versuchstiere

Bei den Schafen handelte es sich um weibliche Tiere der Rasse „Corriedale“ die durchschnittlich 5 Jahre alt waren. Die Versuche wurden zwischen November 2002 und September 2003 in Werribee, Victoria, Australien durchgeführt, wo die Schafe in einer Gruppe auf der Weide (Freilandhaltung) gehalten wurden. Zur Durchführung notwendiger Untersuchungen und zum Auswechseln der Nadeln und Flüssigkeitsbehälter kamen die Tiere alle 2 Tage für einige Stunden in Einzelboxen.

In regelmäßigen Abständen wurden die Schafe gewogen, um eventuelle Änderungen des Körpergewichtes durch die Wirkung des Leptin auf das Fressverhalten, erkennen zu können.

Die Infusion von artifiziell CSF bzw. Leptin wurde bei allen Schafen mit einer Dosis von 2 µg/ h Leptin begonnen und nach einigen Tagen auf 4 µg/ h erhöht.

3.3 Operationen

3.3.1 Anästhesie

Präoperativ wurden die Schafe bei freiem Wasserzugang 24 Stunden nüchtern gehalten. Die Prämedikation erfolgte intramuskulär in die Hintergliedmassen- oder Nackenmuskulatur mit 0,3 mg/kg KM Detomidin (Dormosedan®, 10 mg/ ml, Novartis Animal Health Australasia Pty Limited, 54 Waterloo Road, North Ryde, NSW). Nach ca. 10 Minuten setzte die sedierende Wirkung ein, so dass das Tier anschliessend gewogen und mittels Transportwagen zum OP-Vorbereitungsraum gebracht werden konnte. Das Schaf wurde dann in rechter Seitenlage auf dem Operationstisch gelagert.

Zur Narkoseeinleitung wurde dem Schaf ein Barbiturat (Thiopentone sodium 4-8 mg/ kg KM, Thiobarb Powder®, Jurox Pty Ltd, 85 Gardiners Road, Rutherford, NSW) intravenös injiziert. Nach erfolgter Muskelrelaxation wurde die Intubation durchgeführt und die Inhalationsnarkose mit Sauerstoff und Isofluran® (IsoFlo, Abbott Animal Health, Captain Cook Drive, Kurnell, NSW) aufrechterhalten. Das Narkosegerät war mit einem Überwachungsmonitor verbunden.

Zur intraoperativen Analgesie wurde kurz nach der Einleitung 1 ml Temgesic® intravenös (Buprenorphin HCL 0,3 mg/ ml, Reckitt & Colman Pharm., Hull, England) verabreicht.

3.3.2 Ovariectomie

Nach Lagerung des Tieres in Rückenlage erfolgte eine Rasur des Abdomens, des Mamma-, Anal- und Leistenbereiches (Abb. 3). Anschliessend wurde die Haut des rasierten Bereiches grossflächig mit Betadinseife (Iodine Surgical Scrub®, Povidone iodine 7.5%, VM Supplies Pty Ltd, 10 Prestige Drive, Clayton, Vic. 3168) gereinigt und mit Vetadine Spray® (Pharm Tech Pty Ltd, Unit 15/36 Leighton Place, Hornsby, NSW) desinfiziert. Danach erfolgte die sterile Abdeckung.



Abb.3 Vorbereitung zur Ovariectomie eines Versuchsschafes

Für die Durchführung der Ovariectomie wurde ventral ein paramedianer 12 cm langer Hautschnitt kranial der Mammae gesetzt. Es erfolgte dann die scharfe Durchtrennung der subkutanen Gewebe und der Faszien mit einem Skalpell, wobei auf sorgfältige Blutstillung geachtet wurde. Unter Schonung der grossen Venen wurde die Linea alba freipräpariert. Die Eröffnung der Linea alba erfolgte mit dem Skalpell und anschliessend die vorsichtige Durchtrennung des Peritoneums. Palpatorisch wurden die Blase, die Därme und der Uterus identifiziert. Der Uterus wurde extraabdominal verlagert und nach Identifikation der Ovarien wurden Overholt-Klemmen portionsweise über das Ligamentum ovarii proprium angelegt, gefolgt von einer Durchstechungsligatur der A. und V. ovarica und anschliessendem Absetzen des Ovars. Der gleiche Eingriff

wurde auf der Gegenseite wiederholt. Vor der Reposition des Uterus in das Abdomen, wurden beide Ligaturstellen sorgfältig auf Blutverlust kontrolliert und eine Spülung des Operationsgebietes mit NaCl vorgenommen. Das Peritoneum und die Linea alba wurden mit fortlaufenden Nähten verschlossen. Die Subkutannaht erfolgte fortlaufend mit Vicryl (2/0). Die Haut wurde mit ca. 8 Klammern geschlossen und die Wunde mit einem Sprayverband versorgt.

Die Kontrolle der Wundheilung erfolgte sowohl am 1. als auch 3. Tag postoperativ. Der Allgemeinzustand wurde postoperativ regelmässig überprüft und dokumentiert.

Die Klammern wurden 10 – 14 Tage postoperativ entfernt.

3.3.3 Implantation einer Kanüle in den 3. Ventrikel

Die Tiere wurden vor der Implantation der Kanüle in den 3. Ventrikel für 24h gefastet. Nach Einleitung mit 10ml Thiopental i.v. (Thiovet®, VetLimited, Leylanel, Lancashire, UK) wurde die Anästhesie mittels einer Inhalationsnarkose aufrechterhalten. Präoperativ wurden die Schafe mit Antibiotika (Gentamicin 150mg i.v., Gentamax 100, Nature Vet Pty Ltd, 11 Moores Road, Glenorie, NSW) + Ampicillin 500 mg i.v., Ampicillin 20%, Alfasan International BV, Kuipersweg 9, Woerden, Holland) und Analgetika (Rimadyl 4ml i.v., Pfizer Animal Health, Division of Phizer Australia Pty Ltd, 38-42 Wharf Road, West Ryde, NSW) versorgt. Die Schädelhaut und die Region um die Ohren wurden anschliessend rasiert.

Nach der Einleitung der Allgemeinanästhesie erfolgte das Präparieren der Ohren für die Fixation im stereotaktischen Rahmen. Dafür wurden die Ohren zuerst mit Seife gereinigt und anschliessend mit 70% Ethanol desinfiziert. Der knorpelige Tragus wurde auf einer Länge von ca. 1cm gespalten, um die Einführung der Haltevorrichtung in den Meatus acusticus externus zu ermöglichen.

Zur Lagerung des Kopfes im stereotaktischen Rahmen wurden zunächst die „ear bars“ in den Meatus acusticus externus eingeführt, gefolgt von der Platzierung der „orbita bars“ an den unteren Rand der Orbita und des „mouth bar“ an die Zähne des Oberkiefers. Letzteres wurde mit leichtem Druck kranialwärts erreicht.

Die Kopfhaut wurde nochmals mit Seife gereinigt und mit 70% Ethanol und Betaisodona desinfiziert. Nach der Injektion von Lignocaine mit Adrenalin (0.25 mg / 100ml NaCl 0.9%, Lignocaine 20 with Adrenaline 1-100,000, Ilium Veterinary

Products, Troy Laboratories Pty Ltd, 98 Long Street, Smithfield, NSW) in das gesamte OP-Gebiet wurde dieses mit sterilen Tüchern abgedeckt und die Haut oval-förmig, auf einer Fläche von ca. 6x5cm inklusive Periost entfernt (Abb. 4).

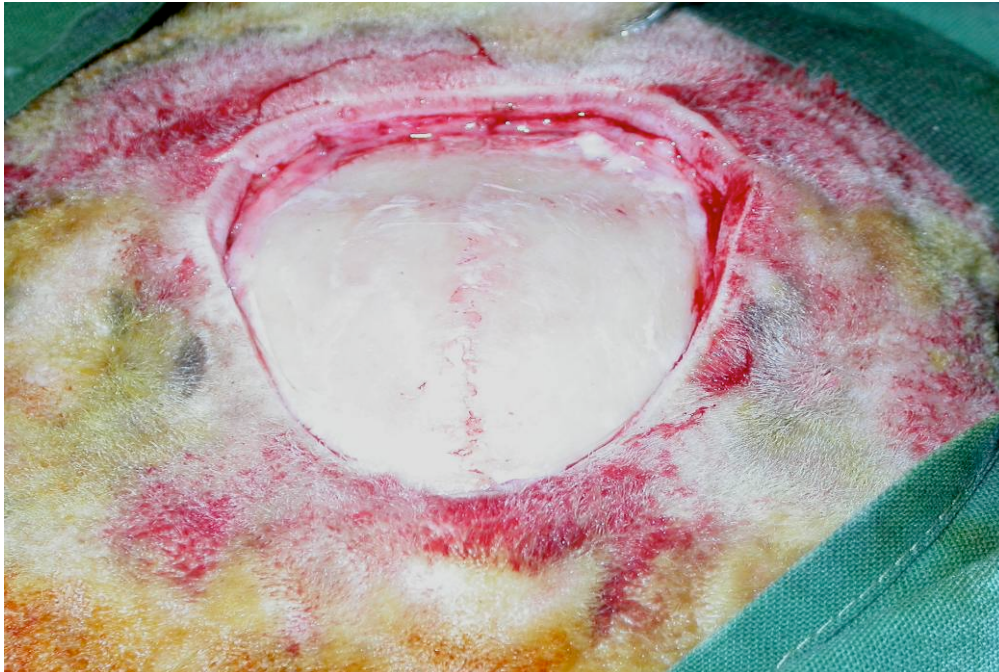


Abb.4 Freipräparierte Kalotte

Anschließend wurde die Kalotte in diesem Bereich mit einem Drillbohrer geöffnet und die Dura präpariert. Dann wurden sechs monokortikale Schrauben kreisförmig um die Schädelosteotomie angebracht, um abschliessend das Acrylat zu befestigen.

Es folgte das Einschrauben des Kanülenhalters in die Kalotte und die Punktion des lateralen Ventrikels. Eine 100cm lange 18G Kanüle wurde dafür 6-8 mm lateral der Mittellinie in die eröffnete Dura mater mit 15-20 Grad Seitneigung tief in die Sagittalebene eingeschoben. Anschließend erfolgte hier die Punktion mit einem Stilet, das mit einem ca. 40cm langen und 2 cm weiten Kunststoffschlauch verbunden war. Dieser Schlauch wurde mit 200 ml NaCl gefüllt, dann ca. 20 cm über den Kopf des Tieres gehalten und wenn die Position der Nadel im Ventrikel korrekt positioniert war sank der NaCl Pegel im Schlauch. Wurde der Schlauch nach unten gehalten floss bei korrekter Position Liquor aus dem Ventrikel und somit stieg der NaCl Pegel im Schlauch.

Der „needle guide“ wurde an dem stereotaktischen Rahmen angebracht (Abb. 5). Die exakte Platzierung der Kanüle in der Mittellinie über dem 3. Ventrikel in Frontalebene

senkrecht nach unten, in der Sagittalebene mit ca. 3 Grad Inklination war extrem wichtig. Um dies zu überprüfen erfolgte anschliessend an die Platzierung eine Injektion von 2,5ml Kontrastmittel (Omnipaque®, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in den lateralen Ventrikel 3 Sekunden später gefolgt von einem seitlichen Röntgen-Bild. Der Abstand von der Strahlenquelle zum 3. Ventrikel betrug 80 cm und der Abstand vom 3. Ventrikel zur Röntgenkassette betrug dabei 20 cm.

Auf dem Röntgenbild wurde der Zielpunkt (3. Ventrikel) markiert und eine Linie als Verlängerung der Nadel für den 3. Ventrikel eingezeichnet und der Abstand zwischen Nadelposition und Zielpunkt gemessen in:

Richtung: „dorsal/ ventral“

Richtung: „rostral/ occipital“

Anschliessend wurde dieser Messwert mit dem Vergrößerungsfaktor 0.8 multipliziert.

Gleichzeitig mit der Positionierung der Nadel erfolgte die Penetration der Dura und des Sinus sagittalis mittels einer scharfen 18 G Kanüle, wobei die Nadel vorerst mit Stilett eingeführt wurde. Anschliessend wurde das Stilett entfernt und der Liquorfluss überprüft. Die Überprüfung des Liquorflusses erfolgte wiederum mit dem oben erwähnten Kunststoffschlauch.

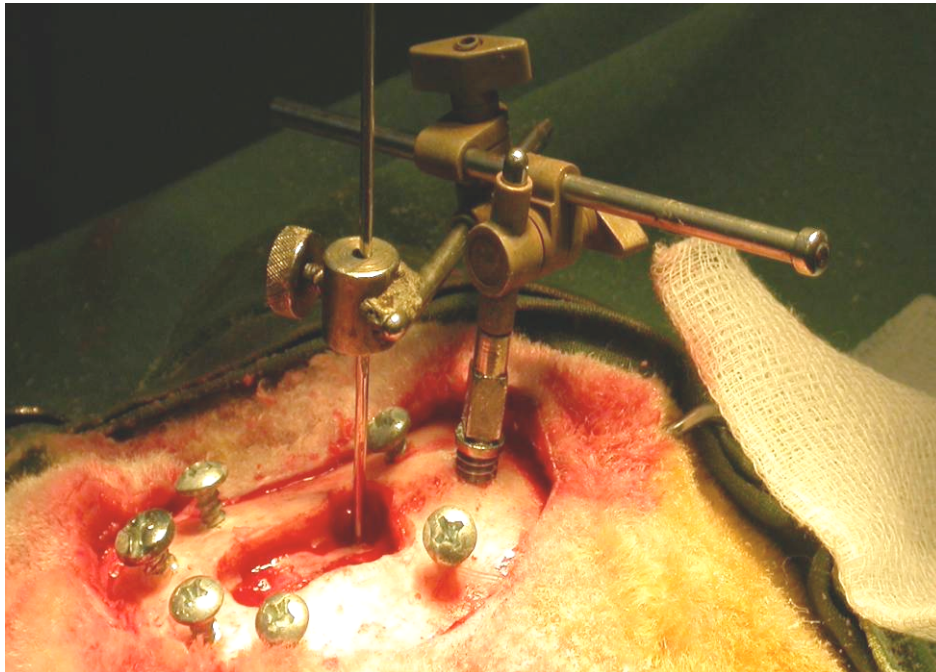


Abb. 5 Einbringen des “needle guide”

Zur Kontrolle wurden 0,5-0,8 ml Kontrastmittel (Omnipaque®, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in den 3. Ventrikel injiziert und nach 1 Sekunde wurde ein seitliches Röntgenbild aufgenommen, um damit die korrekte Lage der Nadel zu überprüfen (Abb. 6).

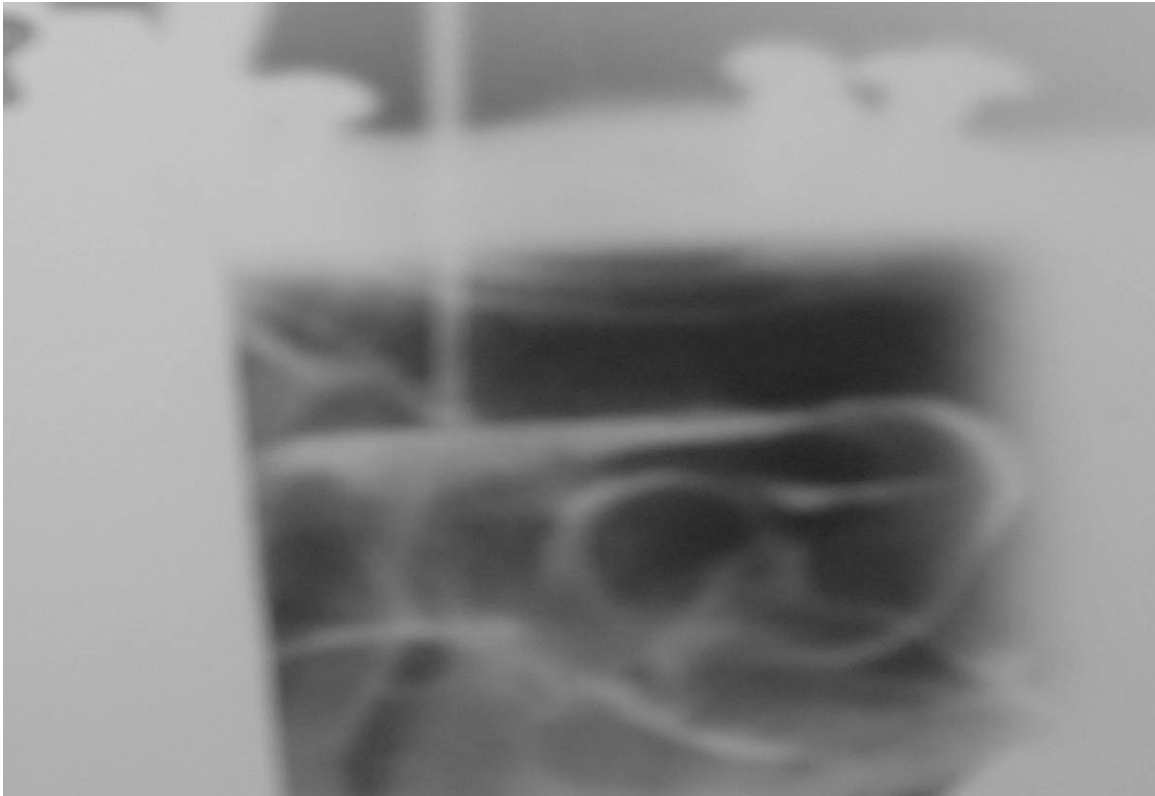


Abb. 6 Röntgenbild zur Überprüfung der Position der Kanüle im 3. Ventrikel

Nach Verifikation der korrekten Lage der Kanüle wurde die Nadel aus dem lateralen Ventrikel entfernt. Auf die Dura wurde ein Gelatine-Schwamm (gelfoam®, Pfizer Inc. 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, USA) gelegt.

Die Kanüle im 3. Ventrikel wurde mittels Acrylat fixiert (Abb. 7). Der weiche Zement wurde folgendermaßen geformt: Vorne wurde der Zement zum Schutz der Nadel aufgehäuft, seitlich wurden zwei Rinnen für die Schrauben und hinten eine Rinne für den Infusionsschlauch gezogen. Seitlich wurden dann zwei Schrauben in Höhe der Nadel zur Fixation des Infusionsschlauches in den weichen Zement gesteckt.

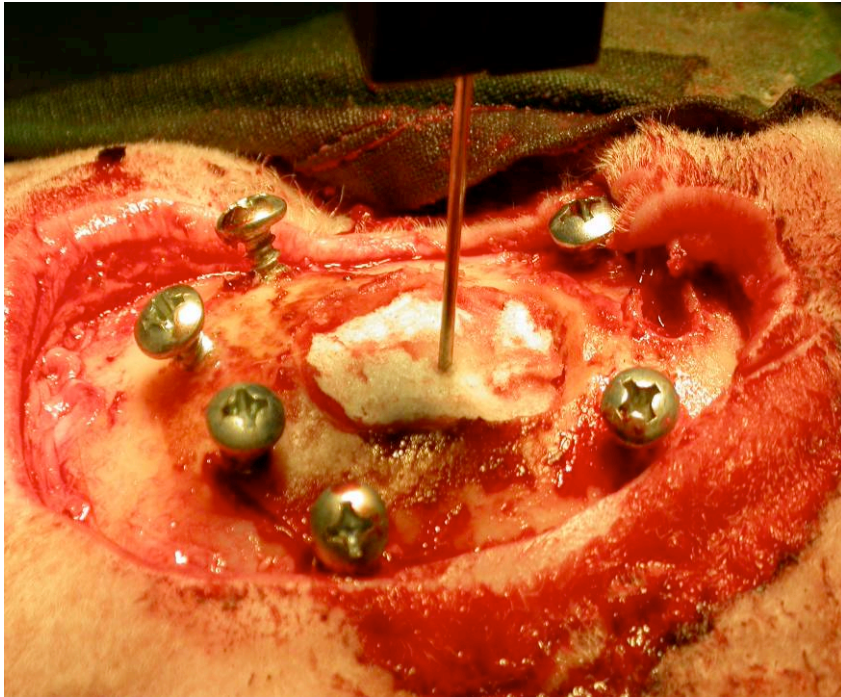


Abb. 7 Sechs monokortikale Schrauben wurden zirkulär um den zentralen Knochendefekt implantiert. Ein Gelatine Schwamm deckt den Knochendefekt ab in dem die Kanüle eingebettet ist.

Falls notwendig erfolgte anschliessend eine Hautnaht zur Adaptation an den Acrylzement.

Der „needle guide“ wurde abgebaut und die Nadel in Höhe des Zementes abgetrennt. Das Reststück wurde ausgemessen und von der Gesamtlänge subtrahiert. Jetzt erfolgte das Anpassen eines Stilett (Länge: Nadel +1mm + oberes Ende, oberes Ende 90° gebogen) und die Insertion des Stilett in die Nadel. Die Nadel wurde mit Knochenwachs abgedichtet und anschliessend mit einem selbstklebenden Band gegen Verschmutzung geschützt (Abb. 8).

Nun konnte der Kopf aus dem Rahmen genommen und die Narkose beendet werden.

Nach dem Auftragen eines antibiotischen Sprays (Alamycin Aerosol. Norbrook Laboratories Australia P/L, 7/1 Trade Park Drive, Tullamarine, Vic.) auf die Wunde wurde das Tier in den Stall transportiert.

Die Kontrolle der Wundheilung erfolgte während den ersten Tagen postoperativ täglich; ebenso wurde der Allgemeinzustand der Schafe regelmässig überprüft und dokumentiert.



Abb. 8 Schafe mit Kanüle im 3. Ventrikel

3.3.4 Implantation einer Kanüle in den lateralen Ventrikel

Es erfolgte die Vorbereitung und Einleitung der Tiere gemäss den Ausführungen in Kapitel 3.3.3.

Hautschnitt (ca. 5cm) ca. 2cm lateral der Mittellinie und Präparation auf die Kalotte. Die Kalotte wurde mit einem Bohrer eröffnet und die Dura präpariert. Es folgte die Punktion des lateralen Ventrikels. Dafür wurde eine 100cm lange 18G Kanüle 6-8 mm lateral der Mittellinie in die eröffnete Dura mater mit 15-20 Grad Seitneigung tief in die Sagittalebene eingeschoben. Anschliessend erfolgte hier die Punktion mit einem Stilet, das mit einem ca. 40cm langen und 2 cm weiten Kunststoffschlauch verbunden war. Dieser Schlauch wurde mit 200 ml NaCl gefüllt, dann ca. 20 cm über den Kopf des Tieres gehalten und wenn die Nadel richtig im Ventrikel positioniert war sank der NaCl Pegel. Wurde der Schlauch nach unten gehalten floss bei korrekter Position der Liquor aus dem Ventrikel und hat damit den NaCl Pegel im Schlauch angehoben.

Bei den Schafen der Gruppe 3 wurde ein starres Rohr fuer die Leptinapplikation verwendet. Wegen hoher Komplikations- und Ausfallraten wurde diese Methode modifiziert und ein weicher ø1,8 mm Silikonschlauch in den lateralen Ventrikel eingebracht (Gruppe 4). Die korrekte Lage dieses Silikonschlauches wurde mit einer Injektion von 2,5ml Kontrastmittel (Omnipaque®, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in den lateralen Ventrikel gefolgt 3 Sekunden später von einem seitlichen Röntgen-Bild überprüft. Der Abstand von der Strahlenquelle zur Schädelmitte betrug bei diesem Röntgenbild 80 cm mit einem Abstand von 20 cm zwischen dem lateralen Ventrikel und der Röntgenkassette.

Dann wurde subkutan der Silikonschlauch occipital und dorsal am Hals entlang geleitet und in Höhe des 4./5. Halswirbels an die Hautoberfläche geführt. Dieser Silikonschlauch wurde mit einer einfachen fortlaufenden Naht fixiert und die Wunde mit einer einfachen Hautnaht geschlossen.

Nun konnte der Kopf aus dem Rahmen genommen und die Narkose beendet werden.

Nach dem Auftragen eines antibiotischen Sprays (Alamycin Aerosol. Norbrook Laboratories Australia P/L, 7/1 Trade Park Drive, Tullamarine, Vic.) wurde das Tier in den Stall transportiert.

Die Kontrolle der Wundheilung erfolgte während der ersten Tage postoperativ täglich; ebenso erfolgte eine regelmässig Überprüfung und Dokumentation des Allgemeinzustands der Schafe.

3.4 Leptinapplikation und Applikation von artifizielllem CSF

Leptin wurde intracerebroventricular (icv) in den dritten Ventrikel und in den lateralen Ventrikel injiziert.

In dieser Studie wurde rekombinantes humanes Leptin, hergestellt von Prof. Jim Goding (Dept. Immunology and Pathology, Monash-University, Clayton Campus, Wellington Road, Clayton, Victoria 3800, Australia) verwendet. Das Leptin wurde den Schafen durch batteriebetriebene Graseby MS16A Infusionspumpen (Graseby Medical Ltd., Gold Coast, Australien) verabreicht. Diese Pumpen waren in einer Art Rucksacksystem auf dem Rücken der Tiere befestigt (Abb. 9). Durch das Gurtsystem auf dem Rücken konnten sich die Schafe während des Versuchs frei bewegen. Jeden zweiten Tag wurde der Leptinbehälter auf dem Rücken der Tiere gewechselt. Das Leptin wurde den

Schafen kontinuierlich über das Pumpen-Schlauch-System direkt in den lateralen bzw. 3. Ventrikel appliziert.



Abb. 9 Das Rucksacksystem zur kontinuierlichen Abgabe von Leptin bzw. artifiziellem CSF wurde den Schafen auf dem Rücken montiert. Dadurch konnten sie sich frei bewegen

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass eine Leptindosis zwischen 1 und 2 $\mu\text{g/h}$, die die Futteraufnahme und das Körpergewicht nicht beeinträchtigt. (94)

Den Schafen der Gruppe 2 wurde 2 $\mu\text{g/h}$ rekombinantes humanes Leptin in den 3. Ventrikel verabreicht und nachdem die Futteraufnahme durch diese Medikation nicht beeinträchtigt war nach zwei Wochen auf 4 $\mu\text{g/h}$ erhöht. Drei Schafen der Gruppe 3 wurde nach 16 Wochen hochdosiert 8 $\mu\text{g/h}$ rekombinantes humanes Leptin in den lateralen Ventrikel appliziert.

Die restlichen Schafe der Gruppe 3 bekamen über 17 Wochen 4 $\mu\text{g/h}$ Leptin in den lateralen Ventrikel appliziert. Die Schafe der Gruppe 4 bekamen für die Dauer des Versuches 4 $\mu\text{g/h}$ in den lateralen Ventrikel appliziert.

Die Applikation des artifiziiellen CSF (cerebrospinal fluid) erfolgte entsprechend der Leptinapplikation entweder in den lateralen oder in den 3. Ventrikel. Die Dosierung des art. CSF betrug 4 $\mu\text{g/h}$ und wurde kontinuierlich über ein Graseby Minipumpen System abgegeben.

3.5 Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA) Messungen

Die Knochenmineraldichte (BMD = bone mineral density) der Schafe wurde *in-vivo* mittels dualer Röntgenabsorptiometrie (DEXA) und *ex-vivo* in Davos mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) Messungen ermittelt.

Für die *in-vivo* Messungen in Australien wurde ein LUNAR DPX-Scanner (Lunar Radiation, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. DEXA basiert auf der Messung der Strahlungstransmission von zwei separaten Photonen-Energien (38 KeV und 70 KeV) durch ein Medium, welches sich aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammensetzt (Knochen (anorganisch) und Weichteilgewebe (organisch)). Aus der gemessenen abgeschwächten Photonenflußrate I_x (Photonen/sec) beider Energieniveaus, der unabgeschwächten Photonenflußrate I (Photonen/sec) sowie dem linearen Schwächungskoeffizienten μ (cm^2/g) kann der Mineralgehalt (Knochenmineralsalzgehalt) des Knochens (Knochenmasse/Knochendichte in g/cm^2) errechnet werden (LUNAR® Handbook of Operators Manual), d.h. bei der DEXA-Methode wird die Abschwächung von Röntgenstrahlen beim Durchstrahlen des Knochens gemessen. Anhand dieses Ergebnisses ergibt sich die Berechnung der im Projektionsfeld liegenden Masse, die auf eine definierte Fläche bezogen wird (g/cm^2). Die planare Projektion der Kalziummasse auf die Fläche ist offenkundig jedoch keine echte Dichte und somit ist der DEXA-Wert keine Dichte, sondern ein Messäquivalent. Die ersten DEXA Messungen wurden bei dieser Studie vor Beginn der Leptin- und CSF- Applikation durchgeführt. Wiederholungen dieser Messungen erfolgten nach 13 und 26 Wochen.

Die Schafe wurden für die DEXA Messungen sediert (Vetanarcol®, Veterinaria AG, Grubenstr. 40, 8045 Zürich) und befanden sich in Bauchlage, wobei die Gliedmassen nach kranial und kaudal gestreckt waren (Abb. 10).

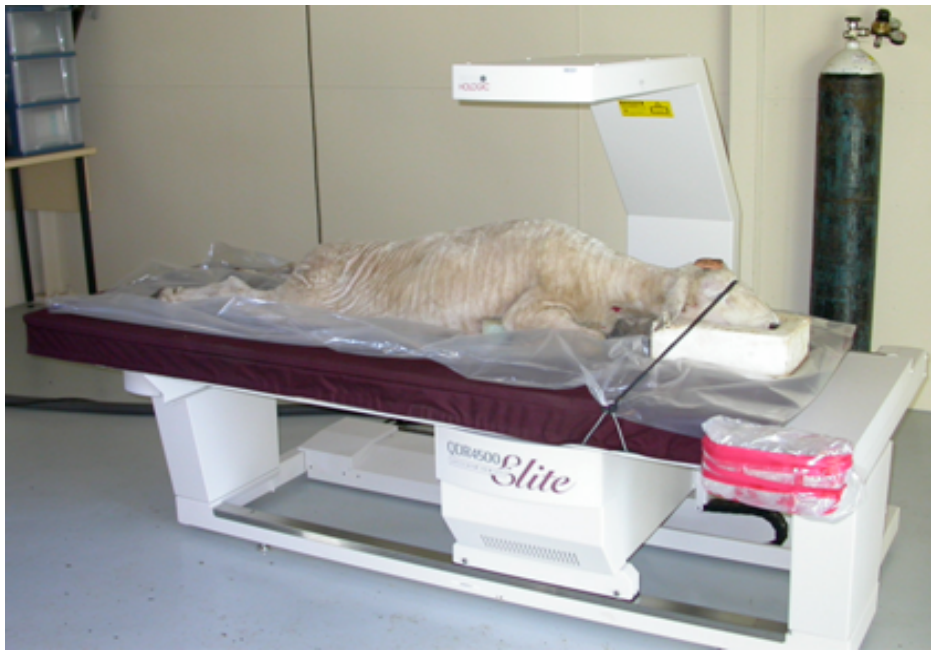


Abb. 10
DEXA
Messung
eines Schafes
unter
Vollnarkose

3.6 Euthanasie, Präparation und Entnahme von Knochenbiopsien

Die Schafe wurden für die Entnahme der Knochen durch eine Überdosis Barbiturat (Vetanarcol®, Veterinaria AG, Grubenstr. 40, 8045 Zürich) euthanasiert

Von allen Tieren wurden die linke Tibia und der Wirbel L6 für *ex-vivo* Testungen entnommen. Die Knochenproben wurden mit feuchter Gaze umwickelt und auf -20°C gelagert. Der Transport erfolgte ohne Unterbrechung der Kühlkette durch Verwendung von Trockeneis und Express-Transport. Bei Ankunft der Knochen im AO Forschungsinstitut Davos waren alle Präparate weiterhin gefroren.

3.7 Knochendichtemessung mittels Computertomographie

Die Knochendichte wurde mit der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) gemessen. Die quantitative Computertomographie ist ein volumetrisches Verfahren, mit dem eine selektive Messung des spongiösen Knochens möglich ist. Aus dem zweidimensionalen Schnitt kann eine dreidimensionale Rekonstruktion des Messfeldes errechnet werden. Das Prinzip der pQCT Messungen beruht auf der Schwächung von Röntgenstrahlen. Die Röntgenstrahlen werden je nach Material entweder durch Streuung oder durch Absorption geschwächt. Die Genauigkeit der Methode liegt bei 5-10%, die Reproduzierbarkeit bei 1-3%. Der Knochenmineralgehalt wird bei der pQCT-Messung in g/cm^3 angegeben. Das verwendete Gerät ist ein

Dünnschicht-Computertomograph der Marke Densiscan 1000® der Firma Scanco Medical AG, Bassersdorf.

Zur Festlegung der Messbereichs wurde vor der eigentlichen Messung ein Scout-View angefertigt der mit einer Röntgenaufnahme vergleichbar ist. Damit konnte die Referenzlinie festgelegt werden, von der aus die Messung beginnen sollten. So konnte eine hohe Standardisierung erreicht werden.

Die Messungen der Knochen erfolgten jeweils im gefrorenen Zustand. Die Knochen waren zum Zeitpunkt der Messung in Plastikhüllen verpackt.

Mit Hilfe einer speziellen Software der Firma Scanco Medical AG, Bassersdorf, wurde das Bild bearbeitet. Für die Auswertung wurde eine Kontur um den Knochen gelegt. An den Tibiae und den L6 wurden ausschliesslich die inneren 50% berechnet. Die Pixel Size des CTs betrug 312,5 µm x 312,5 µm.

3.7.1 Distale Tibia

An der Tibia wurde 3 mm proximal der distalen Gelenkfläche eine Referenzlinie festgelegt. Von dieser Referenzlinie ausgehend wurden 8 Schnitte (Schichtdicke 1mm und Messabstand 1mm) nach proximal gemessen. Der Mittelwert dieser 8 Schnitte wurde für jede einzelne Tibia berechnet.

3.7.2 L6

Zuerst wurde die Gesamtlänge der Wirbel, die hier zwischen 34 mm und 42 mm betrug, gemessen. Ein Wirbel wurde jeweils mit der ventralen Seite nach oben auf die speziell dafür angefertigte Kunststoffhalterung aufgelegt. Anschliessend wurde eine Knochendichtemessung des mittleren Bereichs der Wirbelkörper durchgeführt. Am pQCT wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Von der Mitte des jeweiligen Wirbels ausgehend wurden 4 Schnitte nach proximal und 4 Schnitte nach distal gemessen und die Mittelwerte dieser 8 Schnitte für jeden Wirbel berechnet.

Es wurden pro Schnitt eine Schichtdicke von 1 mm und ein Messabstand von 1mm zwischen den Schnitten festgelegt.

3.8 Mechanische Testung

3.8.1 Kompressionstest von Wirbelkörperbiopsien

3.8.1.1 Spongiosaprobeentnahme

Die Entnahme der Biopsie aus dem Wirbelkörper in axialer Richtung erfolgte bei allen Wirbeln zentral mit einer Diamantbiopsiefräse (TN 09 Diamond Trephine, Länge 80 mm, Aussendurchmesser 9,4 mm, Innendurchmesser 8,5 mm, Synthes Inc., 4436 Oberdorf) die in eine Standbohrmaschine eingespannt war. So konnte eine Rotation des Zylinders beim Abdrehen des Knochen-Zylinders von der Basis verhindert werden. Der Bohrkopf wurde während der Biopsieentnahme mit Ringerlösung gekühlt. Die Biopsie wurde mit einem Kunststoffstößel aus dem Bohrkopf ausgestossen (Abb.11).

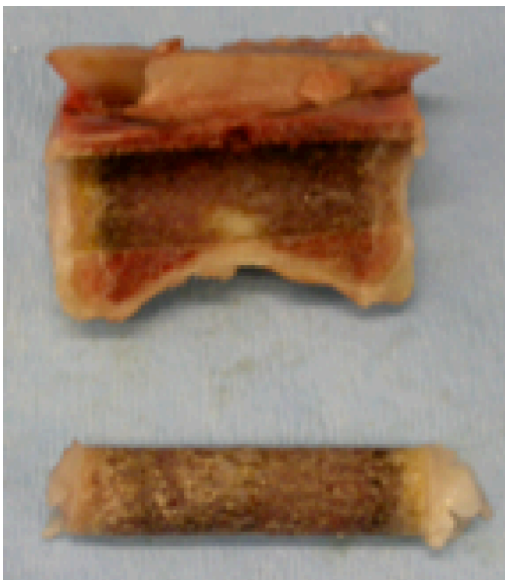


Abb. 11: Biopsie aus L6

Alle Biopsien wurden direkt im Anschluss an die Entnahme in Ringerlösung gelagert und bis zum Kompressionstest im Kühlschrank (+4°C) aufbewahrt.

3.8.1.2 Kompressionstest der Spongiosaprobe

An den entnommenen Wirbelkörperbiopsien wurde ein Kompressionstest in der Materialprüfmaschine Instron 4302 (Instron series IX automated materials testing system, Instron Ltd., High Wycombe, England) durchgeführt.

Aus den Wirbelkörpern (L6) wurden die zentral gewonnenen Knochenbiopsien verwendet. Zur Kortikalis wurde auf beiden Seiten ein gleich grosser Abstand eingehalten und zentral ein 8,5 x 8,5 mm grosser Spongiosazylinder mit Hilfe des Sägemikrotoms gewonnen. Die Spongiosazylinder wurden in der Materialprüfmaschine Instron 4302 in kranio-kaudaler Richtung mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/ min komprimiert (Abb. 12).

Die Kraft-Weg-Kurve wurde digital aufgezeichnet und die Versagenslast (kN) sowie die Steifigkeit (N/mm) ermittelt (Abb. 13).

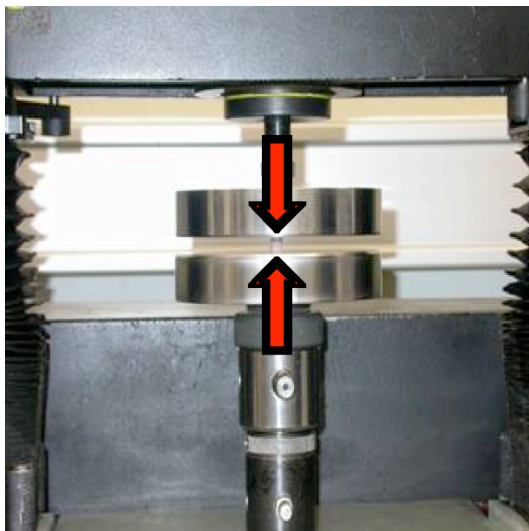


Abb. 12: Kompressionstest auf Instron

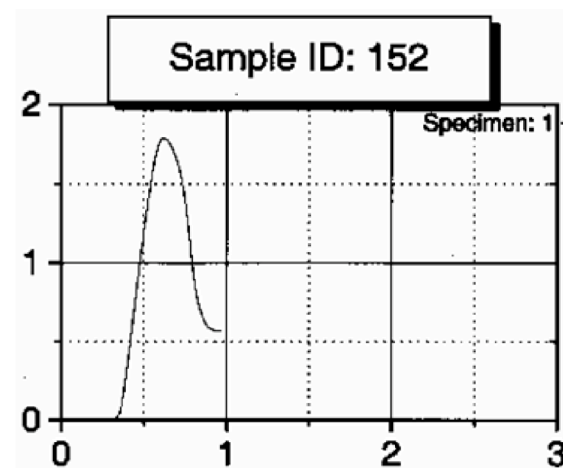


Abb. 13: Kraft-Weg-Kurve

3.8.2 Vier-Punkt-Biegung der Tibia

Zur Vier-Punkt-Biegung der Tibia wurde diese nach folgendem standardisiertem Verfahren eingebettet und in der Biegevorrichtung der Maschine positioniert: Nach der Längenmessung der Tibia - von der Eminentia intercondylaris bis zur tibiotarsalen Gelenkfläche - wurde der Mittelpunkt der Tibia markiert. Ausgehend von diesem Mittelpunkt wurden nach proximal und distal jeweils 7 cm abgemessen. Diese 14 cm lange Diaphyse wurde nicht eingebettet. Eine Schraube zur Verstärkung der Rotationsstabilität wurde quer durch das distale Ende der Tibia eingebracht. Das proximale und distale Ende der Tibia wurden bei Bedarf auf die Grösse des Einbettgefässes zurechtgesägt und dann in Beracryl®, einem Zweikomponenten-Polymersystem (W.Troller AG, 4854 Fuluibach/ Schweiz) eingebettet.

Die Tibia wurde auf die Auflageflächen der Vier-Punkt-Biegemaschine gelegt und die Maschine sorgfältig ausgerichtet (Abb. 14). Jede Tibia wurde 2-mal gebogen und nach jeder Messung um 90° gedreht. Es erfolgte somit eine Biegung in den Körperachsen von kranio-kaudal und latero-medial. Die Belastung des Knochens in kN und die Verbiegung des Knochens in mm wurden automatisch aufgezeichnet und die maximale Kraft und Steifigkeit bestimmt (Abb.15). Der rote Bereich in der Abb. 15 war der standardisierte Bereich in dem bei allen Proben die Steifigkeit bestimmt wurde (Abb. 15). Die Belastung der Tibia erfolgte bei 1mm/min bis 800 Nm, d.h. es handelte sich um eine elastische nicht-destruktive Messung. Die Testung erfolgte bei Raumtemperatur und während der Testung wurden die Proben mit physiologischer Ringerlösung feucht gehalten.

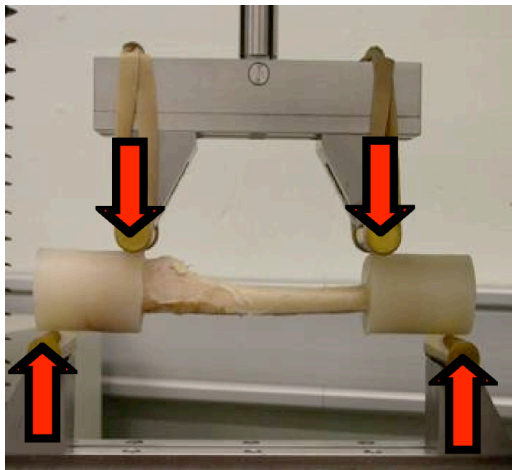


Abb. 14: Vier-Punkt-Biegung der Tibia

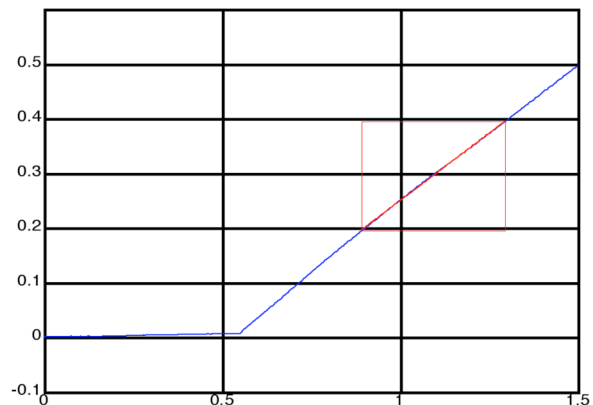


Abb. 15: Kraft-Biegungs-Kurve

3.8.3 Torsionstest der Tibia (Steifigkeit, Festigkeit)

Neben der Vier-Punkt-Biegung wurden die mechanischen Eigenschaften der Tibia im Torsionstest geprüft. Der Testaufbau für die MTS Maschine (MTS Systems Corporation) zur Durchführung des Torsionstests wurde im AO-Forschungsinstitut im Rahmen einer früheren Studie entwickelt (Abb. 16).(106) Die Belastung fand bis zum Versagen, d.h. Bruch des Knochens statt. Die Knochen wurden so eingespannt, dass der proximale Anteil der Tibia oben war. Die Testung erfolgte bei Raumtemperatur und während der Testung wurden die Proben mit physiologischer Ringerlösung feucht gehalten.

Zur Messung des Drehmoments wurde eine Torsionsmesszelle für 100 Nm (MESSRING, München) benutzt. Die Winkelgeschwindigkeit betrug 5,0 Grad / Sekunde, der Messbereich wurde auf 90 Grad limitiert und mit einer Genauigkeit von 0,5 Grad festgelegt. Die Torsion entsprach einer Aussenrotation des Beines.

Die Reaktion des Knochens unter Torsionsbelastung wurde kontinuierlich digital aufgezeichnet (Abb. 17). Das maximale Drehmoment (Nm), die Torsionssteifigkeit sowie die maximale Winkeldeformation in Grad wurden in dem festgelegten roten Bereich wie auf der Abb. 17 gezeigt bestimmt.

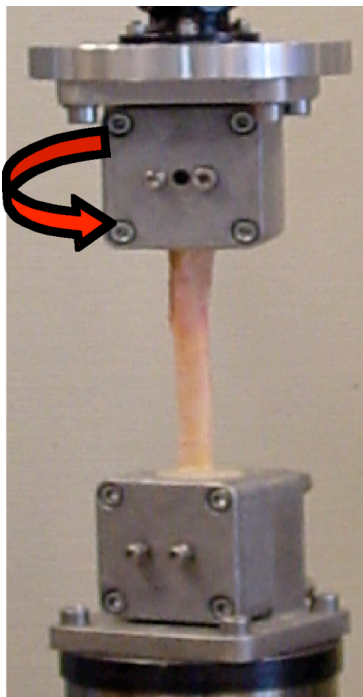


Abb. 16: Torsionstest der Tibia

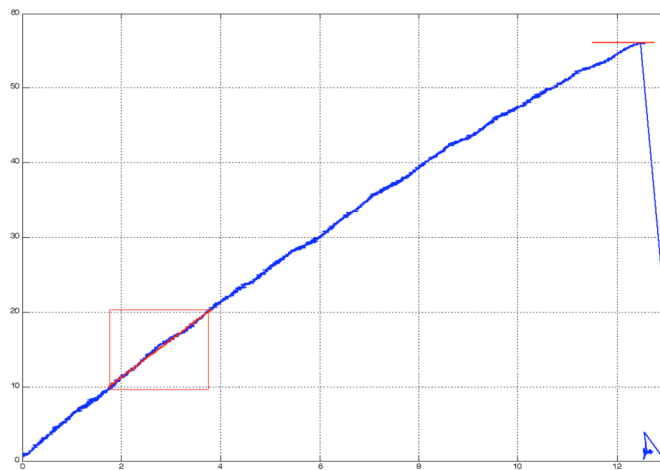


Abb. 17: Drehmoment-Winkel-Kurve

3.9 Statistik

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS (SPSS Inc. 233 S. Wacker Drive, Chicago, IL 60606-6307) durchgeführt. Aufgrund der geringen Probenanzahl musste ein nicht parametrisches Testverfahren gewählt werden. Die Gruppe in der das Leptin in den 3. Ventrikel appliziert wurde, musste wegen der geringen Gruppengröße ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Knochendichtebestimmung und der mechanischen Testung wurden mit dem Kruskal Wallis Test auf signifikante Unterschiede in den 4 Gruppen untereinander getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Aufgeführt wurden der Mittelwert, die

Standardabweichung, sowie der kleinste und größte Wert. In den Grafiken wurden Maximalwert, Minimalwert, der Median und Einzelwerte aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Verlaufsbeobachtungen und Ausfallraten

Während der ersten Wochen postoperativ traten bei den am 3. Ventrikel operierten Schafen schwerwiegende Probleme wie zum Beispiele Infektionen, neurologische Symptome und Verstopfung der Kanüle auf, so dass bei 8 Schafen der Versuch vorzeitig abgebrochen werden musste. Die Knochen dieser Schafe sind deshalb nicht in die Knochendichtemessung und mechanische Testung aufgenommen wurden:

In Gruppe 2, wo Leptin in den 3. Ventrikel appliziert wurde, wurde Schaf 88 nach 21 Wochen, Schaf 202 nach 9 Wochen und Schaf 222 nach 11 Wochen euthanasiert. In der Kontrollgruppe und der modifizierten Leptingruppe traten keine Komplikationen auf.

	<u>geplant</u>	<u>überlebt</u>	<u>Ausfallrate</u>
Kontrollgruppe:	n=10	n=10	0%
Leptingruppe (3. Ventrikel):	n=7	n=2	71.5%
Art. CSF Gruppe:	n=9	n=6	33%
Leptingruppe (lateraler Ventrikel):	n=6	n=3	50%
Leptingruppe (lateraler Ventrikel mod.):	n=5	n=5	0%

4.2 Körpergewicht

Die Schafe der Kontrollgruppe hatten am Ende der Versuchsdauer im Mittel $5.71 \pm 5.28\%$ ihres Anfangskörpergewichtes verloren (Abb. 18).

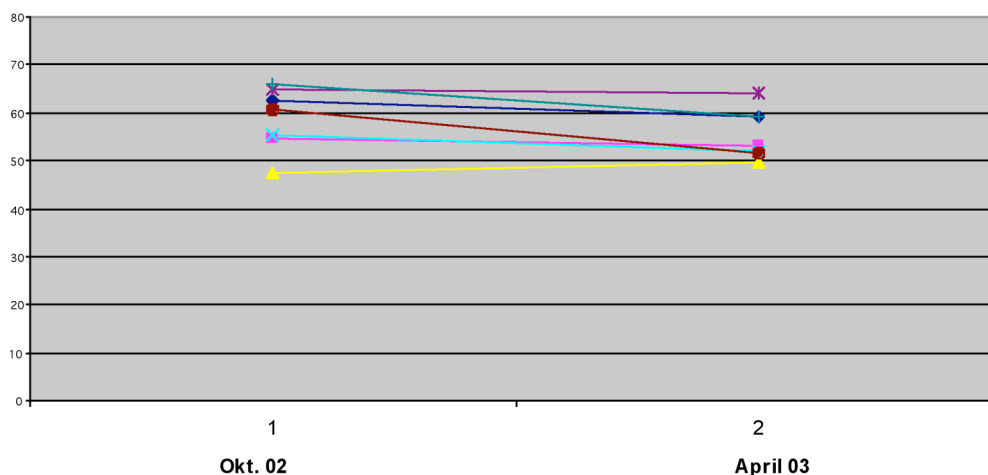


Abb. 18: Körpergewicht der Kontrollgruppe

Die Schafe der Leptingruppen 2 und 3 kombiniert hatten am Ende der Studie im Mittel $22.66 \pm 5.02\%$ ihres Anfangskörpergewichtes verloren (Abb.19).

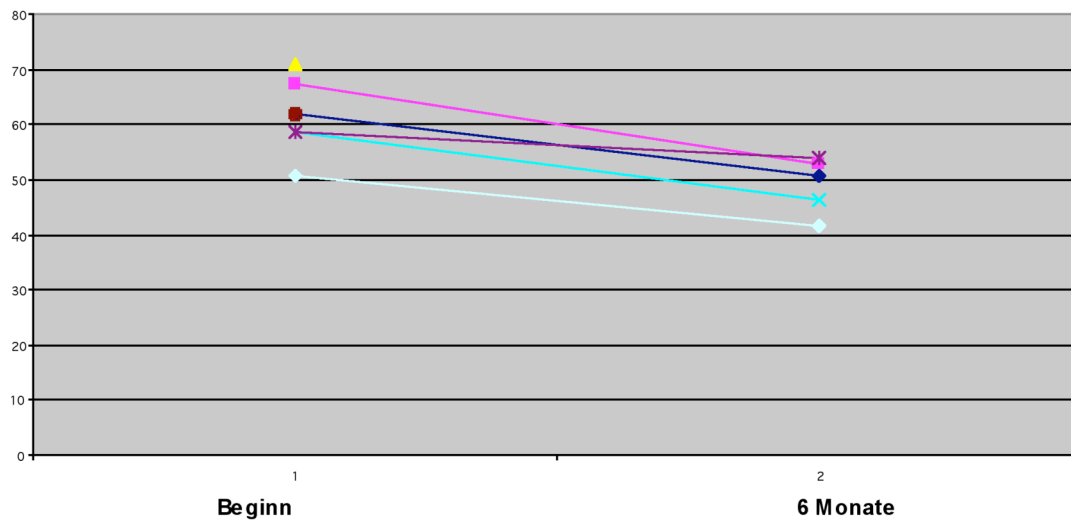


Abb. 19: Körpergewicht der Leptingruppen 2 und 3

Die Schafe der artifiziellen CSF Gruppen hatten am Ende der Studie im Mittel $7.35 \pm 1.76\%$ ihres Anfangskörpergewichtes verloren (Abb. 20).

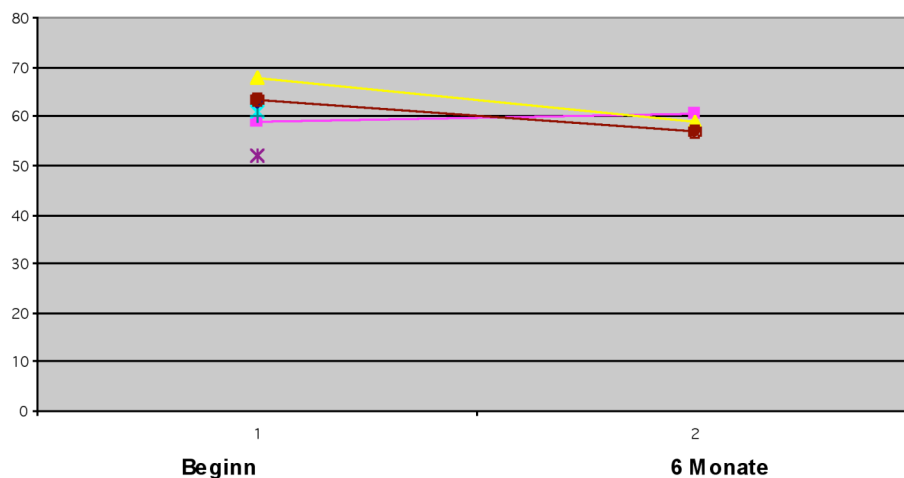


Abb. 20: Körpergewicht der artifiziellen CSF Gruppe

4.3 Knochendichte

4.3.1 DEXA Messungen

4.3.1.1 Knochendichte im Verlauf

Die Knochendichte wurde in vivo dreimal im Abstand von jeweils 12 Wochen bei den Schafen der Gruppen 1, 3 und 5 nach den Operationen (Ovariectomie, Implantation des

Führungsschlauches) gemessen. Die Knochendichte der Schafe der Gruppen, die im Februar 2003 mit in die Studie aufgenommen wurden, wurde nur einmal zu Beginn der Studie gemessen. Die DEXA Messungen der Kontrollgruppe über einen Zeitraum von 6 Monaten lassen keinen eindeutigen Trend erkennen. Die Werte am Ende der 6 Monate befinden sich auf etwa dem gleichen Niveau wie zu Beginn der Studie (Abb. 21).

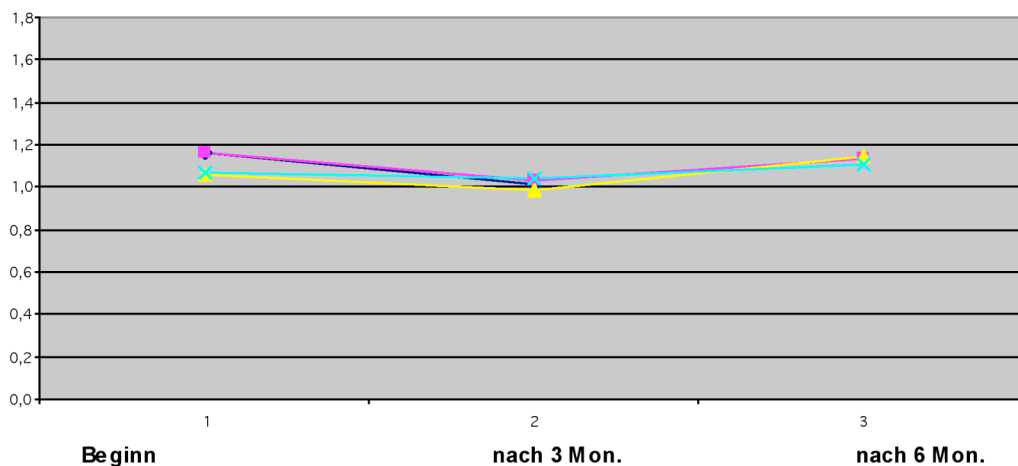


Abb. 21: DEXA Messung der Kontrollgruppe

Die DEXA Messungen der Leptingruppen 2 und 3 lassen aufgrund der hohen Ausfallrate nur Aussagen über einen Zeitraum von 3 Monaten zu. Auch hier ist kein eindeutiger Trend was Anstieg oder Abfall der Knochenmineraldichte betrifft zu erkennen (Abb. 22).

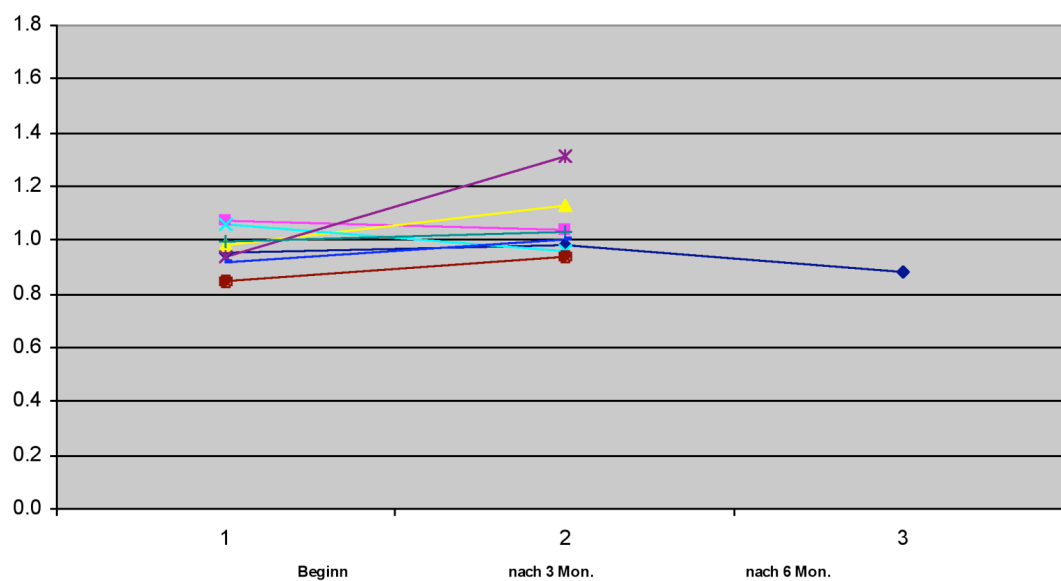


Abb. 22: DEXA Messung der Leptingruppen 2 und 3

Auch die DEXA Messungen der art. CSF Gruppe lassen keine Änderungen in der Entwicklung der Knochenmineraldichte erkennen (Abb. 23).

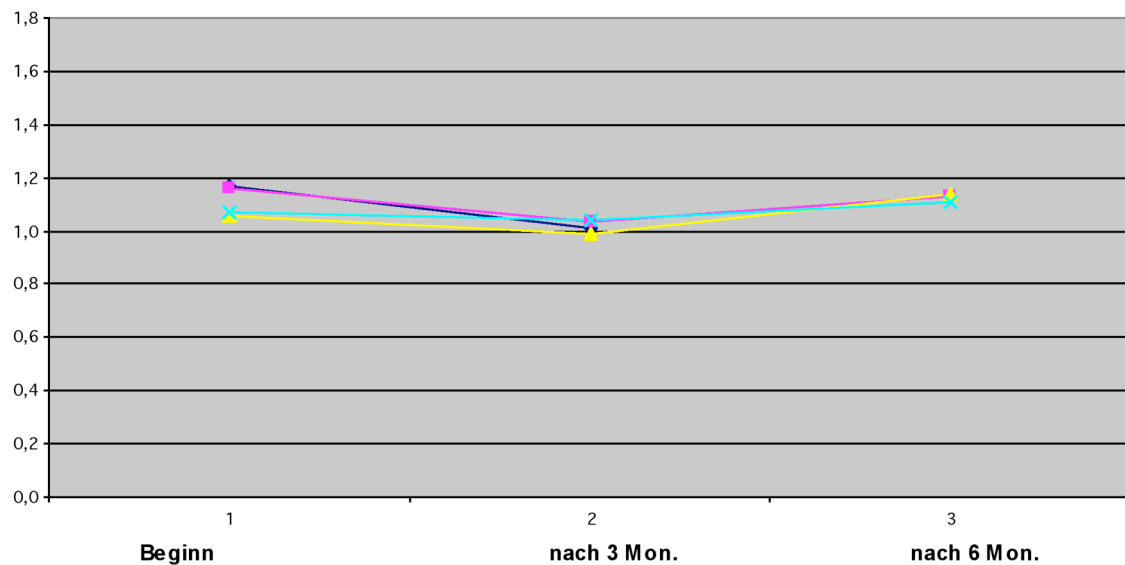


Abb. 23: DEXA Messung der artifizierten CSF Gruppe

4.3.2 Periphere quantitative Computertomographie

Durch die hohe Ausfallrate in der Gruppe 3 standen am Ende des Versuches nur noch 2 Tiere für Tests an L6 zur Verfügung. Diese geringe Probenanzahl konnte bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt werden. Die Knochendichte der L6 und der linken Tibia wurde mit dem pQCT gemessen. Die Dichte des spongiösen Anteils der Knochen (innere 50%) wurde ermittelt (Tab. 2 & 3).

4.3.2.1 L6

Tab. 2: Knochenmineraldichte (g/cm^3) L6

BMD L6	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
control (n=10)	0.578	0.035	0.527	0.628
Leptin LV (n=3)	0.583	0.039	0.521	0.619
leptin LVm (n=5)	0.573	0.010	0.566	0.584
CSF (n=6)	0.563	0.027	0.536	0.589

Es gibt keine signifikanten Unterschiede ($p=0.341$) in der Dichte der Spongiosa der zwischen den 4 unterschiedlichen Gruppen (Abb. 24).

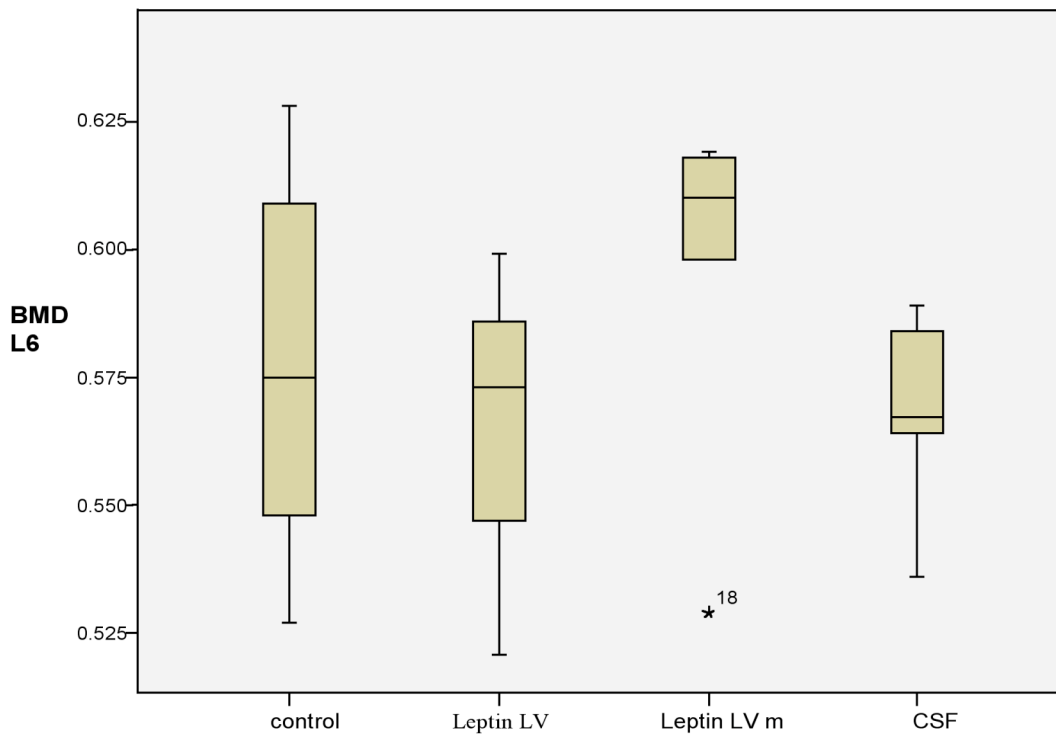


Abb. 24: Knochenmineraldichte (g/cm^3) in L6

4.3.2.2 Tibiae

Tab. 3: Knochenmineraldichte (g/cm^3) Tibia

BMD Tibia	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
control	0.659	0.056	0.550	0.751
leptin LV	0.645	0.080	0.466	0.730
leptin 3V	0.647	0.061	0.549	0.711
leptin LVm	0.648	0.059	0.588	0.705
CSF	0.709	0.055	0.646	0.751

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.762$) ergab zwischen den 5 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Spongiosadichte der Tibiae (Abb. 25).

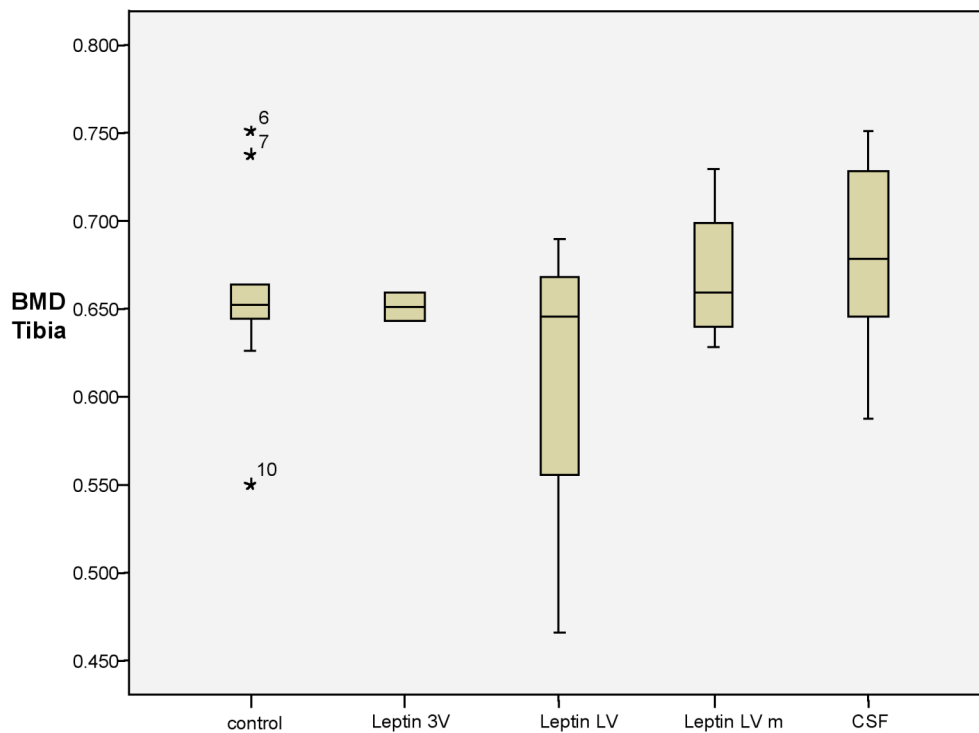


Abb. 25: Knochenmineraldichte (g/cm^3) Tibia

4.4 Mechanische Testung

4.4.1 Kompressionstest von Wirbelkörperbiopsien

Der Kompressionstest bei den Wirbelkörperbiopsien L6 wurde durchgeführt, um mögliche Unterschiede der biomechanischen Eigenschaften der Knochen zwischen vier Gruppen feststellen zu können. Es wurden die Steifigkeit und die Versagenslast bis zum Bruch des Knochens bestimmt (Tab. 4).

4.4.1.1 Steifigkeit

Tab. 4: Steifigkeit (N/mm) der Spongiosaprobe L6

Steifigkeit	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Control (n=10)	7.891	1.619	4.9	9.4
leptin LV (n=3)	8.617	0.617	7.7	9.4
Leptin LVm(n=5)	8.628	0.298	8.3	8.9
CSF (n=6)	8.434	0.301	8.2	8.8

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.469$) ergab zwischen den 4 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bei der Steifigkeit der Spongiosaprobe der L6 (Abb.26).

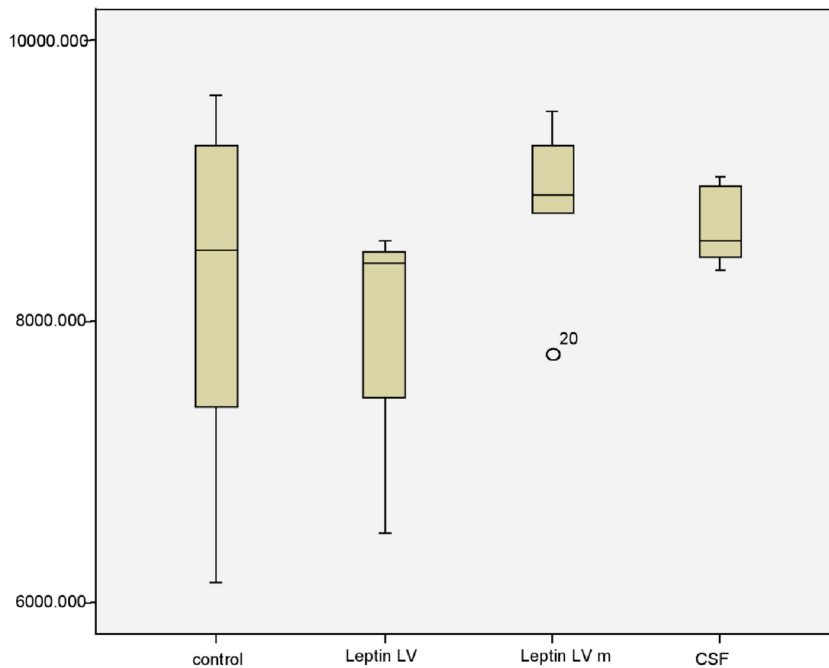


Abb. 26: Steifigkeit der Spongiosaprobe L6 im Kompressionstests

4.4.1.2 Drucklast

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.184$) ergab zwischen den 4 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bei der Drucklast der Spongiosaprobe der L6 (Tab. 5, Abb. 27).

Tab. 5: Drucklast (kN) der Spongiosaprobe L6

Drucklast	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Control (n=10)	1.650	0.357	1.012	2.051
leptin LV(n=3)	1.743	0.384	0.981	2.187
leptin LVm (n=5)	1.736	0.121	1.617	1.858
CSF (n=6)	1.615	0.157	1.491	1.792

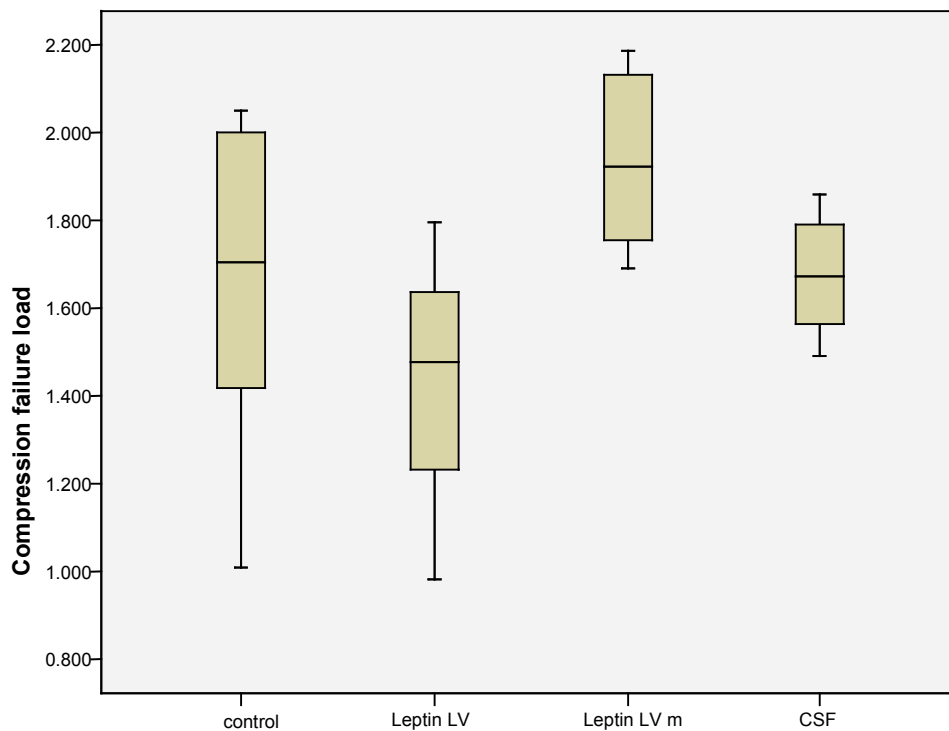


Abb. 27: Drucklast (kN) der Spongiosaprobe L6

4.4.2 Vier-Punkt-Biegung der Tibia

Es wurden pro Tibiae jeweils eine Messung in anterior-posteriorer Position und eine zweite Messung in lateral-medialer Position gemacht (Tab. 6 & 7).

4.4.2.1 Steifigkeit in anterior-posterior

Tab. 6: Steifigkeit (N/mm) der Tibiae in anterior-posterior.

4 PKB: AP	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Control (n=10)	0.549	0.078	0.439	0.656
leptin LV (n=3)	0.485	0.121	0.297	0.673
Leptin 3V (n=2)	0.593	0.070	0.508	0.658
Leptin LVm (n=5)	0.534	0.129	0.395	0.651
CSF (n=6)	0.640	0.088	0.575	0.740

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.060$) ergab zwischen den 5 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit der Tibiae bei der 4 Punkt Biegung in anterior-posteriorer Position (Abb. 28).

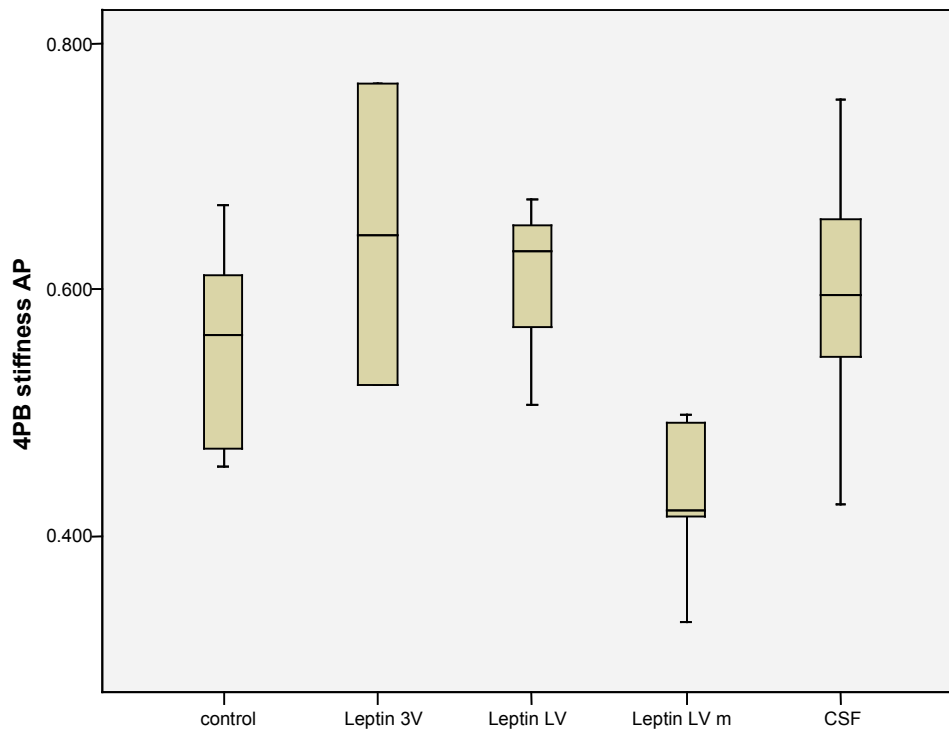


Abb. 28: Steifigkeit (N/mm) der Tibiae in a.p.

4.4.2.2 Steifigkeit in lateral-medial

Tab. 7: Steifigkeit (N/mm) der Tibiae in l.m.

4 PKB: LM	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
control (n=10)	0.622	0.078	0.523	0.727
leptin LV (n=3)	0.590	0.138	0.405	0.797
leptin 3V (n=2)	0.731	0.060	0.658	0.801
leptin LVm (n=5)	0.586	0.152	0.425	0.727
CSF (n=6)	0.708	0.103	0.631	0.826

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.545$) ergab zwischen den 5 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Steifigkeit der Tibiae bei der 4 Punkt Biegung in lateral-medialer Position (Abb. 29).

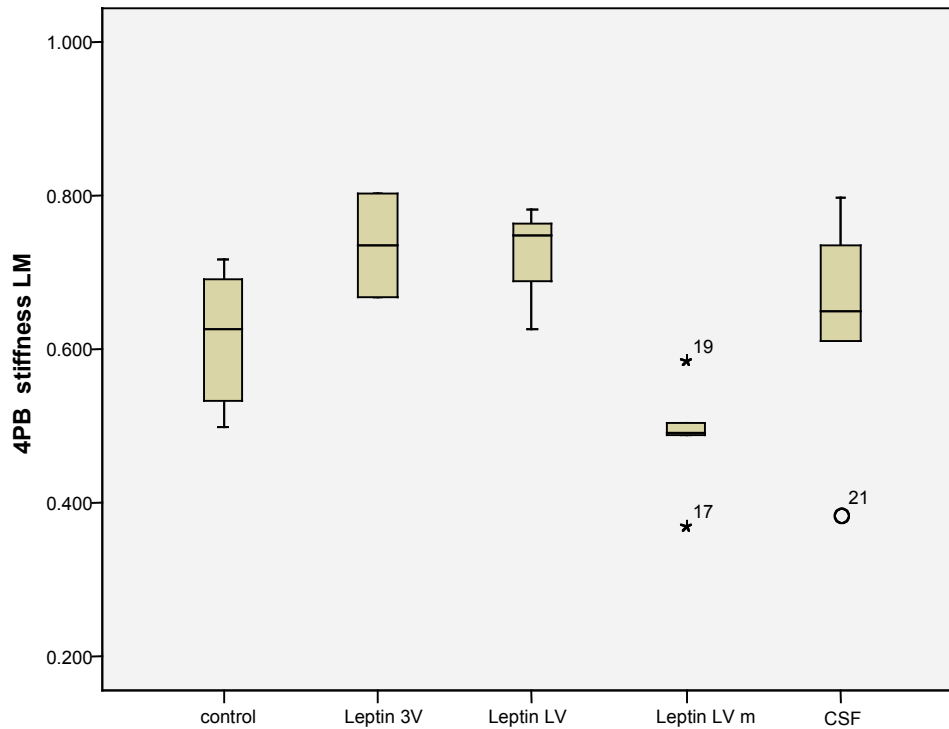


Abb. 29 Steifigkeit (N/mm) der Tibiae in l.m.

4.4.3 Torsionstest der Tibia

Die Torsionstests wurden an der linken Tibia durchgeführt. Die Torsion erfolgte in Aussenrotation (Abb. 8 & 9).

4.4.3.1 Torsionssteifigkeit der Tibiae

Tab. 8: Torsionssteifigkeit (Nm/ °) der Tibiae

Steifigkeit	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
control (n=10)	3.696	1.139	1.508	5.215
leptin LV (n=3)	3.160	1.510	1.561	5.448
leptin 3V (n=2)	4.713	1.006	3.593	6.102
leptin LVm (n=5)	1.931	0.211	1.715	2.137
CSF (n=6)	5.049	0.614	4.531	5.728

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.072$) ergab zwischen den 5 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Torsionssteifigkeit der Tibiae (Abb. 30).

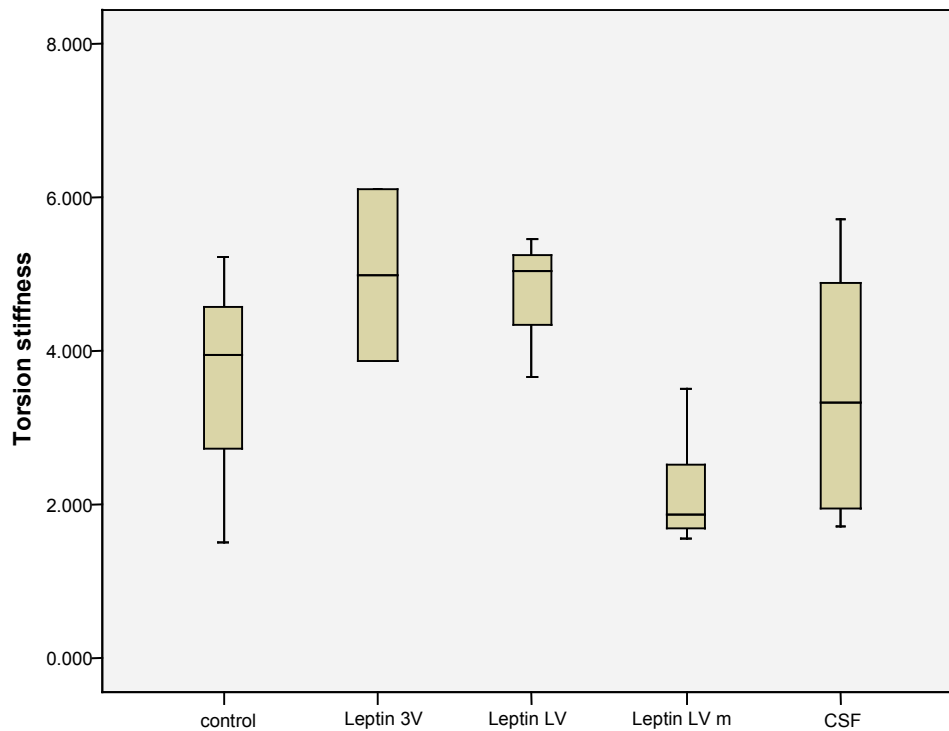


Abb. 30: Torsionssteifigkeit (Nm/°) der Tibiae

4.4.3.3 Maximales Moment der Tibiae

Tab. 9: Maximales Moment (kN) der Tibiae

max. Mo ment	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
control (n=10)	13.163	1.482	10.824	15.845
leptin LV (n=3)	12.370	3.956	5.876	19.259
leptin 3V (n=2)	12.312	1.732	9.349	13.559
leptin LVm (n=3)	11.962	3.236	9.088	15.468
CSF (n=6)	10.378	0.074	10.328	10.463

Der Kruskal Wallis Test ($p = 0.174$) ergab zwischen den 5 unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede des maximalen Moments der Tibiae beim Torsionstest (Abb. 31).

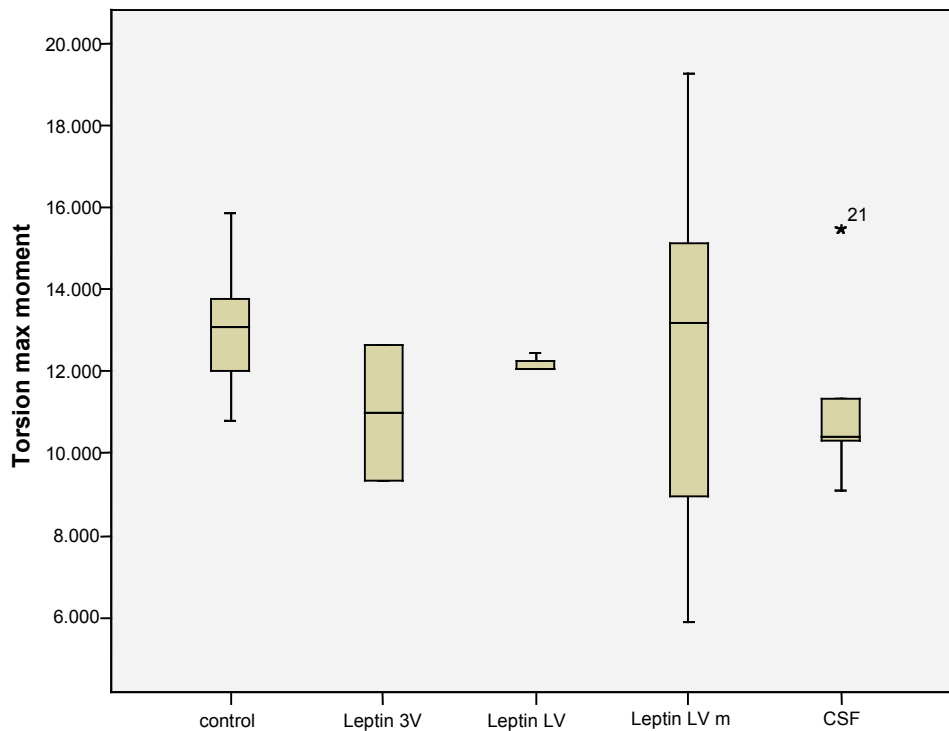


Abb. 31: Maximales Moment (kN) der Tibiae

4.5 Korrelationen

Die Berechnung der Korrelation zwischen der Knochenmineraldichte der L6 und der Drucklast der L6 ergibt einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0.52$ und zeigt somit eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der pQCT Messungen und den Ergebnissen des Kompressionstests (Abb. 32).

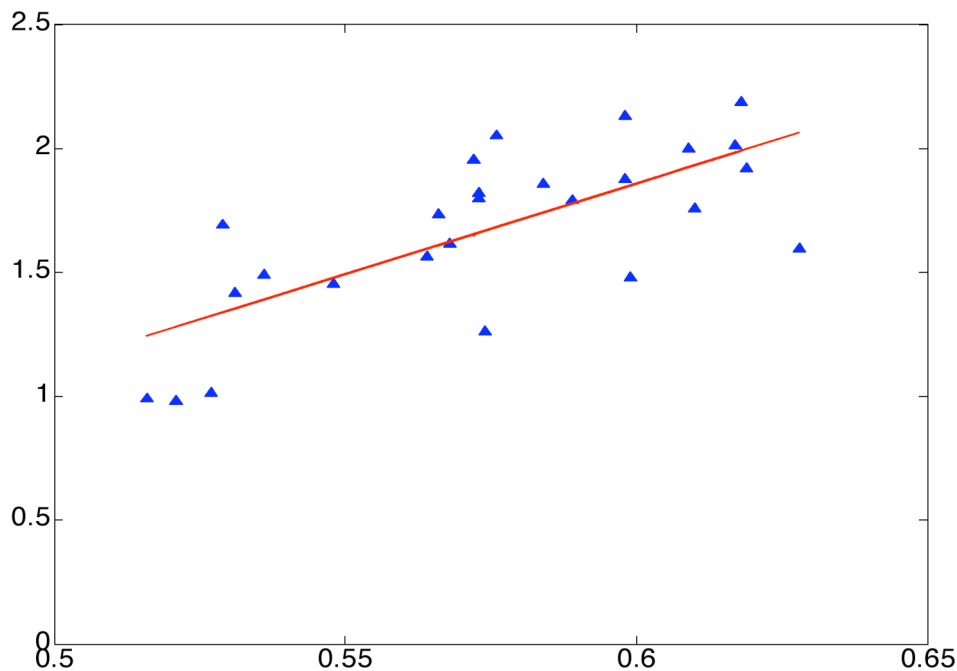


Abb. 32 Korrelation zwischen Knochenmineraldichte (g/cm^3) und Drucklast (kN)

5. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war die Analyse des Einflusses einer intra-cerebroventrikulären Injektion von Leptin auf die Knochenmineraldichte und die biomechanischen Eigenschaften des Knochens. Das von Amling et al. entwickelte Mäusemodell der zentralen Regulation der Knochendichte durch die intracerebroventrikuläre Applikation von Leptin wurde auf Schafe übertragen.

Ursprünglich bestand die Studie aus 3 Gruppen: Kontrollgruppe, mit CSF behandelte Gruppe und mit Leptin behandelte Gruppe. Aufgrund großer Verluste sind nachträglich 2 weitere Gruppen mit in die Studie aufgenommen worden: In diesen Gruppen wurde das Leptin statt mit einem starren Rohr mit einem weichen Gummischlauch in den lateralen Ventrikel injiziert.

1. Überlebenszeiten

Während den ersten postoperativen Wochen traten bei den am 3. Ventrikel operierten Schafen schwerwiegende Probleme auf, so dass 8 Schafe verstarben oder euthanasiert werden mussten. Die Operationsmethode, bei der eine metallene Kanüle (18G) in den 3. Ventrikel eingeführt und ein Acrylblock auf dem Kopf befestigt wurde, von dem ein

Schlauch zu der Graseby Pumpe führte, verursachte diese Ausfälle möglicherweise. Deshalb wurden die Schafe der Gruppen 4 und 5 mit einer neuen Methode operiert: Bei dieser Methode wurde ein weicher Silikonschlauch in den lateralen Ventrikel implantiert, der dann über eine Strecke von ca. 15 cm unter der Haut dem Nacken des Schafes entlang bis direkt zur Graseby Pumpe verläuft, die ebenfalls in einem Rucksacksystem auf dem Rücken des Schafes befestigt wurde. Es wird angenommen, dass nicht die Leptin-Applikation in den lateralen Ventrikel, sondern die Verwendung eines weichen Silikonschlauches und dessen Weiterleitung subkutan zu einer 100%igen Überlebensrate geführt hat. Das Ziel einer möglicherweise anschliessenden Studie könnte sein, die Operationsmethode so zu verbessern, dass ein weicher Silikonschlauch in den 3. Ventrikel gelegt werden kann und dann ebenfalls unter der Haut dem Nacken des Tieres bis zu einem Pumpensystem entlang läuft. Ein möglicher Vorteil der Applikation direkt in den 3. Ventrikel ist die Nähe des 3. Ventrikel zum Hypothalamus im Vergleich zum lateralen Ventrikel. Dadurch wird das Leptin nicht durch den Liquor verdünnt, der im Plexus chorioideus am lateralen Ventrikel gebildet wird, sondern erreicht konzentriert die Rezeptoren des Hypothalamus.

In Bezug auf die Ausfallrate und Nebenwirkungen bietet die hier beschriebene Technik keinen Vorteil gegenüber Tiermodellen mit Kortikoidbehandlung.(13, 115) Die Technik der kontinuierlichen intrazerebralen Injektion bietet jedoch noch viel Potential für Verbesserungen.

2. Körpergewicht

Leptin beeinflusst nicht nur den Knochenumbau, sondern auch die Futteraufnahme (94). Durch die Applikation von Leptin kommt es zu einer verminderten Futteraufnahme, welche zu einer Reduktion des Körpergewichtes der Schafe führt. In dieser Studie kam es bei den Schafen, denen Leptin verabreicht wurde zu einer Reduktion des Körpergewichtes um 22.6%, d.h. die Leptindosis, die den Schafen verabreicht wurde hatte einen Effekt auf die Futteraufnahme. Die Operation hat möglicherweise einen zusätzlichen Effekt auf die Futteraufnahme, da auch die schein-behandelte Gruppe nach Applikation von CSF einen grösseren Abfall des Körpergewichtes als die Kontrollgruppe zeigte.

Studien von Clarke et al. haben den Einfluss einer intra-cerebralen Injektion von Leptin auf die Futteraufnahme von Schafen gezeigt und dienten als Orientierung für die

Dosierung in der vorliegenden Studie (94). Die Abnahme der Futteraufnahme dient damit als Beweis, dass die Leptinapplikation eine Wirkung hat.

3. Knochendichte

Die Knochendichtebestimmung ist eine wichtige Methode, um Veränderungen der Knochenstruktur frühzeitig zu erkennen. In dieser Studie wurden DEXA (Dual Energy X-Ray Absorptiometry) Messungen zur Verlaufsbeobachtung der Knochenstruktur und Messungen mit dem pQCT (peripheral quantitative computed tomography) nach Entnahme der Knochen durchgeführt. Die Knochenmineraldichte (bone mineral density = BMD) ist ein Indikator für die Veränderungen des Knochenmineralgehaltes. Über den BMD wird beim Menschen die Krankheit Osteoporose definiert. Um Osteoporose handelt es sich dann, wenn der BMD-Wert 2,5 Standardabweichungen oder mehr unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen liegt.

Bei der DEXA Messung werden anorganische Materialien, d.h. Knochenminerale in einem organischen Körper selektiv quantifiziert. Wenn die Photonenstrahlen durch Gewebe treten, werden sie je nach Gewebe unterschiedlich geschwächt, d.h. Photonenstrahlen mit niedriger Energie werden in Knochen und im Weichteilgewebe stärker geschwächt als hochenergetische Photonenstrahlen. Es handelt sich um ein zweidimensionales Verfahren, d.h. die Angabe der Knochendichte erfolgt in g/cm^2 . Die Vorteile der DEXA Messung sind, dass in vivo Verlaufsbeobachtungen mit geringer Strahlenbelastung möglich sind. Nachteilig wirkt sich aus, dass eine Unterscheidung zwischen Kortikalis und Spongiosa nicht möglich ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass Verfälschungen durch das Fell (z.B. Wollmenge), durch Verschmutzungen im Fell oder Kalkablagerungen in den Gefässen auftreten können. Des weiteren ist die Reproduzierbarkeit der DEXA Messungen im Vergleich zu pQCT Messungen niedriger, da es kaum möglich ist, bei einer wiederholten Messung den exakt gleichen Messbereich wieder auszuwählen (110). Auch kann man bei dieser Studie wegen der grossen Anzahl von Ausfällen nicht von einer Verlaufsbeobachtung der Knochendichte sprechen.

Bei den DEXA Messungen wurde keine signifikante Abnahme der Knochenmineraldichte in der Leptingruppe (Leptin in den 3. Ventrikel) im Vergleich zu den anderen Gruppen festgestellt. Bei den Schafen, denen Leptin in den lateralen Ventrikel appliziert wurde, wurden wegen der grossen Ungenauigkeit der DEXA

Messungen keine Messungen mehr durchgeführt. Messdaten liegen daher dazu nicht vor.

Die periphere Computertomographie (pQCT) dagegen bietet in diesem Fall die besseren Aussagen über die Knochenmineraldichte, da die Knochen zum Zeitpunkt der Messungen frei von Weichteilgewebe und weiteren störenden Faktoren waren. Diese Methode ermöglicht die detaillierte Darstellung des Knochens und seine Differenzierung in Kortikalis und Spongiosa. Die Ergebnisse (Masse, Dichte) sind physikalisch korrekt und man kann mit Hilfe neuer pQCTs und μ CT Messungen auch Aussagen zur Knochenarchitektur treffen. Die entscheidenden Vorteile des pQCTs im Vergleich mit DEXA sind die dreidimensionale Lokalisation des Messvolumens, die isolierte Erfassung dieses Volumens ohne Überlagerung des umgebenden Gewebes und die Separation trabekulären und kortikalen Knochens. Mit QCT wird die Konzentration des Knochenmineralgehaltes innerhalb einer definierten Auswerteregion bestimmt. Die Reproduzierbarkeit ist bei diesem Gerät mit einem Reproduzierbarkeitsfehler von $\pm 0.3\%$ gut. Die Lokalisationen für die BMD Messungen an den L6 und den Tibiae wurden aufgrund folgender Überlegungen festgelegt: Bei L6 wurden Schnitte in der Mitte der Wirbelkörper gemessen, da diese genau den Abschnitt repräsentieren, der auch bei der mechanischen Tests untersucht wird. Der distale Bereich der Tibia wurde zum einen wegen der Möglichkeit der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien ausgewählt und zum anderen, weil nur die trabekulären Anteile des Knochens bestimmt werden sollten. Es mußte daher ein metaphysärer Bereich mit einer möglichst homogenen Trabekelstruktur gewählt werden. Weiterhin wurden die Knochenproben zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien unter anderem von Ch. Lill (13) gewählt.

Die pQCT Messungen der L6 und der Tibiae ergaben zwischen den 5 Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu finden sich bei Gerlach et al. (115) signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen und auch in anderen Studien werden signifikante Unterschiede bei ovariectomierten Schafen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt. (17,19,90) Hier kann das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes daran liegen, dass die Dauer der Studie zu kurz war. Es wird daher erforderlich sein, den Schafen über einen Zeitraum von mindestens 1 Jahr Leptin zu applizieren, damit Veränderungen am Knochen

diagnostiziert werden können. Dies wiederum macht dieses Modell unattraktiv für Studien denen es dienen sollte.

4. Mechanische Tests

Die mechanischen Tests wurden durchgeführt, um mögliche Veränderungen der trabekulären oder kortikalen Knochenstruktur zu erkennen. Durch Osteoporose werden Veränderungen der Knochenmineraldichte, der Knochen volumendichte und der geometrischen Verteilung und Anordnung der Trabekel verursacht. Zur Erkennung von Veränderungen an osteoporotischen Knochen wurden dazu von der Food and Drug Administration (61) speziell diese Tests insbesondere an Wirbelkörpern und Röhrenknochen empfohlen. Für die biomechanischen Tests kann man entweder trabekulären oder kortikalen Knochen verwenden (111), wobei im trabekulären Anteil früher Veränderungen des Mineralgehaltes und somit der biomechanischen Eigenschaften zu erwarten sind als im kortikalen Anteil. Die Ursache für diese zeitlich unterschiedlichen Veränderungen liegt in der grösseren Oberfläche der Spongiosa, an der früher Umbauprozesse an der Mikroarchitektur einsetzen können als an der kompakten Kortikalis. Die Veränderung der Trabekelanordnung im Knochen, die Veränderung der Qualität des Knochenmaterials und die Veränderungen der Knochen volumendichte und der geometrischen Verteilung haben einen sehr grossen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens (38,53,54). Die Grösse der Probe, deren Vorbehandlung, Feuchtigkeitsgrad und Temperatur, die Raumtemperatur, sowie die Frequenz und Dauer der Belastung haben wie auch das Alter, das Geschlecht, die Rasse und weitere biologische Variablen einen Einfluss auf die Resultate (112). Die Knochen mussten nach der Entnahme mehrmals tiefgefroren und wieder aufgetaut werden, was jedoch nach Borchers et al (113) keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der biomechanischen Testung hat.

Ziel des Kompressionstests der Wirbelkörper L6 war es, Veränderungen der Bruchlast des trabekulären Anteils des Wirbels festzustellen. Der erste Höchstwert im Kraft-Weg-Diagramm dient als Bruchkriterium. Durch die Grösse des Knochenzylinders ist gewährleistet, dass ausreichend spongiöser Knochen für eine aussagekräftige Messung vorhanden ist. Mit Hilfe der Lochsäge war es möglich, zwei planparallele Flächen zu schaffen, um eine gleichmässige Druckverteilung zu erzielen. Hier konnten im

Gegensatz zu anderen Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. (115, 54)

Das Kraft-Weg-Diagramm beginnt mit einer Kontaktphase, während der die Kraft von der gesamten Probe aufgenommen wird. Anschliessend kommt es zu einem linearen Kurvenverlauf bis die Kompression stärker ist als die elastischen Kräfte des Knochens. Dann entsteht eine plastische Verformung des Bioplates, die durch die Zersplitterung, den Bruch, der Probe beendet wird.

Bei der 4-Punkt-Biegung wirkt die Kraft auf 4 definierte Punkte der eingebetteten Tibiae ein. Während des Tests wurden die Kraft, die auf die Probe eingewirkt und die Deformation der Probe während der Krafteinwirkung aufgezeichnet und aus diesen Werten die Versagenslast (N) und die Steifigkeit (MPa) berechnet. Es ergaben sich weder bei der 4 Punkt Biegung in kraniokaudaler Richtung noch bei der 4 Punkt Biegung in lateromedialer Richtung signifikante Unterschiede zwischen den 5 Gruppen.

Der Torsionstest der Tibiae diente der Messung der Steifigkeit und Festigkeit der Kortikalis und damit als Indikator für die Knochenstärke. Der Torsionstest der Tibiae fand nach der 4-Punkt-Biegung dieser Tibiae statt. Die Tibiae waren also für den Torsionstest ebenfalls in Beracryl eingepottet und nur der Tibiaschaft war auf eine Länge von 14 cm frei. Die Torsionsbelastung der Tibiae in Aussenrotation wurde bis zum Versagen durchgeführt, wobei die Knochen immer innerhalb der „freien“ 14 cm, die physiologischerweise nur aus Kortikalis bestehen, frakturierten. Anhand des Torsionstest wurden die Torsionssteifigkeit (N/°), das maximale Drehmoment (Nm) und der Bruchwinkel (°) bestimmt. Bei den Ergebnissen des maximalen Drehmoment, der Torsionssteifigkeit und des Bruchwinkels ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 5 Gruppen.

In einer Studie von Gerlach et al.(115) konnten signifikante Unterschiede bei der Knochendichte und beim Kompressionstest der Lendenwirbelkörper zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe jedoch nicht bei der 4-Punkt-Biegung der Tibiae und dem Torsionstest der Tibiae festgestellt werden.

5. Das Schaf als Tiermodell

Das Schaf wurde schon in mehreren anderen Studien als potentiell Tiermodell zur Erforschung der Osteoporose verwendet (10). C. Lill et al. haben gezeigt, dass das

Schaf einen ähnlichen Knochenstoffwechsel wie der Mensch in Bezug auf den Kurzzeiteffekt von Gestagenen zu haben scheint (13). Diese Ähnlichkeit des humanen Knochenstoffwechsels und des Knochenstoffwechsels des Schafes macht das Schaf für die Osteoporoseforschung anwendbar. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass allein durch Ovariectomie eine Reduktion der Knochendichte der Schafwirbel erreicht werden kann (12,14). Der Nachteil des von Lill et al. beschriebenen Schafmodells, bei dem durch die Verabreichung von Glukokortikoiden Osteoporose (BMD Abnahme in der Spongiosa 37%) verursacht wird, liegt in den starken Nebenwirkungen. Diese Nebenwirkungen beinhalten Muskelatrophie, Stammfettsucht, Alopezie und führen zum Teil auch zum Tod des Tieres (13,92). Es besteht somit ein grosser Bedarf nach einem neuen Ansatz, um Osteoporose beim Schaf auszulösen. Eine Möglichkeit bestand in der Übertragung des von Amling et al. (35,93) entwickelten Modells auf Schafe, bei dem bei Mäusen durch zentrale Regulation des Knochenstoffwechsels Osteoporose ausgelöst wurde. Die zentrale Regulation des Knochenstoffwechsels wird durch genau dosierte Leptingaben so verändert, dass eine Osteoporose ausgelöst wird. Clarke et al. haben gezeigt, dass die Futteraufnahme beim Schaf durch icv Leptinapplikation vermindert werden kann (94). Durch die Feststellung der zentralen Wirkung von Leptin auf die Futteraufnahme beim Schaf wurden grosse Hoffnungen auf die Übertragbarkeit des Mäusemodells hinsichtlich der Veränderungen der Knocheneigenschaften gesetzt. In der Art und Weise, wie dieses Studienmodell aufgestellt wurde, konnte jedoch keine Beziehung zwischen der Leptinapplikation und den mechanischen Eigenschaften des Knochens hergestellt werden. Ein Grund hierfür ist sicherlich, wie auch Deloffre et al. (114) in ihrer Methylprednisolonstudie feststellen mussten, die relativ kurze Induktionszeit der Studie von maximal 6 Monaten. Aus ethischen Gründen sollte eine Wiederholung dieser Studie ohne eine Verbesserung der Operationsmethode wegen der hohen Ausfallrate nicht durchgeführt werden. Die klinische und wissenschaftliche Konsequenz ist daher, dass nach dem aktuellen Stand dieses Tiermodell für die Osteoporoseforschung nicht geeignet erscheint.

Das Schaf selbst scheint ein geeignetes Tiermodell für die Osteoporoseforschung zu sein. Ziel kommender Studien sollte sein, ein ethisch vertretbares und für die Praxis sinnvolles Verfahren zur Erzeugung von Osteoporose beim Schaf zu etablieren.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement*. 2000;17(1):1-45.
- (2) Boyle P, Leon ME, Autier P. Epidemiology of osteoporosis. *J Epidemiol Biostat*. 2001;6(2):185-192.
- (3) Riggs BL, Melton LJ, III. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*. 1995;17(5 Suppl):505S-511S.
- (4) Walker-Bone K, Dennison E, Cooper C. Epidemiology of osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001;27(1):1-18.
- (5) Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001;28(1):80-86.
- (6) Walsh WR, Sherman P, Howlett CR et al. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop*. 1997;(342):218-227.
- (7) Franck WM, Olivieri M, Jannasch O, Hennig FF. Expandable nail system for osteoporotic humeral shaft fractures: preliminary results. *J Trauma*. 2003;54(6):1152-1158.
- (8) Larsson S. Treatment of osteoporotic fractures. *Scand J Surg*. 2002;91(2):140-146.
- (9) Lill CA, Hesseln J, Schlegel U et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res*. 2003;21(5):836-842.
- (10) Turner AS. The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Vet J*. 2002;163(3):232-239.
- (11) Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 1995;16(4 Suppl):277S-284S.

- (12) Fini M, Pierini G, Giavaresi G et al. The ovariectomised sheep as a model for testing biomaterials and prosthetic devices in osteopenic bone: a preliminary study on iliac crest biopsies. *Int J Artif Organs*. 2000;23(4):275-281.
- (13) Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Effect of ovariectomy, malnutrition, and glucocorticoid application on bone properties in sheep: A pilot study. *Osteoporos Int*. 2002;13(6):480-486.
- (14) Turner AS, Alvis M, Myers W et al. Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):395S-402S.
- (15) Chavassieux P. Bone effects of fluoride in animal models in vivo. A review and a recent study. *J Bone Miner Res*. 1990;5 Suppl 1:S95-S99.
- (16) Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G et al. Dose effects on ewe bone remodelling of short-term sodium fluoride administration--a histomorphometric and biochemical study. *Bone*. 1991;12(6):421-427.
- (17) Chavassieux P, Pastoureau P, Chapuy MC et al. Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporos Int*. 1993;3(2):97-102.
- (18) Geusens P, Boonen S, Nijs J et al. Effect of salmon calcitonin on femoral bone quality in adult ovariectomized ewes. *Calcif Tissue Int*. 1996;59(4):315-320.
- (19) Hornby SB, Ford SL, Mase CA, Evans GP. Skeletal changes in the ovariectomised ewe and subsequent response to treatment with 17 beta oestradiol. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):389S-394S.
- (20) Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU. Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):421S-427S.
- (21) WHO. Aktuelle Internetseite: www.who.int. internet . 2000.
- (22) Lochmueller EM, Eckstein F. Biomechanische Tests in der Evaluaiton osteodensitometischer Verfahren. *Osteologie*. 2002;154-177.

- (23) Nicholson PH, Cheng XG, Lowet G et al. Structural and material mechanical properties of human vertebral cancellous bone. *Med Eng Phys.* 1997;19(8):729-737.
- (24) International Osteoporosis Foundation World Congress on Osteoporosis. Lisbon, Portugal, 10-14 May 2002. Abstracts. *Osteoporos Int.* 2002;13 Suppl 1:A32-160, i.
- (25) Bonjour JP, Burckhardt P, Dambacher M et al. [Epidemiology of osteoporosis]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1997;127(16):659-667.
- (26) Melton LJ, III. How many women have osteoporosis now? *J Bone Miner Res.* 1995;10(2):175-177.
- (27) Ross PD. Osteoporosis. Frequency, consequences, and risk factors. *Arch Intern Med.* 1996;156(13):1399-1411.
- (28) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1-129.
- (29) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1-129.
- (30) Fleisch H. [Osteoporosis]. *Arch Gynecol Obstet.* 1989;246 Suppl:S73-S75.
- (31) Riggs BL, Melton LJ, III. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med.* 1986;314(26):1676-1686.
- (32) Hawker GA. The epidemiology of osteoporosis. *J Rheumatol Suppl.* 1996;45:2-5.
- (33) W.S. Browner, A.R. Pressman, M.C. Nevitt and S.R. Cummings , Mortality following fractures in older women: the Study of Osteoporotic Fractures. *Arch Intern Med* **156** (1996), pp. 1521–1525
- (34) D.M. Kado, W.S. Browner, L. Palermo, M.C. Nevitt, H.K. Genant and S.R. Cummings , Vertebral fractures and mortality in older women: a prospective study. *Arch Intern Med* **159** (1999), pp. 1215–1220

- (35) Amling M, Pogoda P, Beil FT et al. Central control of bone mass: brainstorming of the skeleton. *Adv Exp Med Biol.* 2001;496:85-94.
- (36) Amling M, Pogoda P, Beil FT. Trabecular Bone Architecture and the Competence of Bone. *NY.* 2001.
- (37) Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999;13(23):3037-3051.
- (38) Ringe J.D. Osteoporose: Postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes. 1995.
- (39) Heaney RP. The natural history of vertebral osteoporosis. Is low bone mass an epiphenomenon? *Bone.* 1992;13 Suppl 2:S23-S26.
- (40) Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone.* 1996;18(2):109-113.
- (41) Gortz B, Fassbender WJ. [Genetics of osteoporosis]. *Orthopade.* 2001;30(7):412-417.
- (42) Wasnich RD. Epidemiology of osteoporosis in the United States of America. *Osteoporos Int.* 1997;7 Suppl 3:S68-S72.
- (43) Jergas M, Schmid G. [Conventional radiology of osteoporosis and radiographic absorptiometry]. *Radiologe.* 1999;39(3):174-185.
- (44) Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodelling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone.* 1986;7(3):213-221.
- (45) Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R et al. Cancellous bone remodelling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res.* 1990;5(4):311-319.
- (46) Battmann A, Schulz A, Stahl U. [Cellular senescence: a mechanism of the development of osteoporosis?]. *Orthopade.* 2001;30(7):405-411.
- (47) Kessenich CR, Rosen CJ VitaminD and bone status in elderly women *Orthop Nurs.* 1996 May-Jun< 15(3):67-71

- (48) McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med.* 1992;93(1):69-77.
- (49) Bell NH. Vitamin D metabolism, aging, and bone loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(4):1051.
- (50) Keck E. KHP. Osteoporose: Klinik - Diagnostik - Therapie. 2003.
- (51) Ringe J.D. Diagnose, Prophylaxe und Therapie. 1993.
- (52) Sanders KM, Nicholson GC, Ugoni AM, Seeman E, Pasco JA, Kotowicz MA), Fracture rates lower in rural than urban communities: the Geelong Osteoporosis Study, *J Epidemiol Community Health.* 2002 Jun;56(6):466-70
- (53) Bohm AM, Jungkunz B. Bending stiffness of healing fractures can be calculated from quantitative computed tomography. *Eur J Radiol.* 1999;30(1):28-32.
- (54) Deloffre P, Hans D, Rumelhart C et al. Comparison between bone density and bone strength in glucocorticoid-treated aged ewes. *Bone.* 1995;17(4 Suppl):409S-414S.
- (55) Parfitt AM. Implications of architecture for the pathogenesis and prevention of vertebral fracture. *Bone.* 1992;13 Suppl 2:S41-S47.
- (56) Melton LJ, III, Chao E.Y. LJ. Biomechanical aspects of fractures. 1988.
- (57) Wehr U, Diagnose, Prävention und Therapie von Knochenstoffwechselerkrankungen in der Humanmedizin. Möglichkeiten und Grenzen von biochemischen Knochenmarkern. 1998
- (58) Cerroni AM, Tomlinson GA, Turnquist JE, Gryn timer MD, Bone mineral density and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago, Am. J. Phys. Anthropol. 2000 Nov, 113 (3): 389-410
- (59) Bellino FL, Wise PM. Nonhuman primate models of menopause workshop. *Biol Reprod.* 2003;68(1):10-18.
- (60) Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone.* 1995;16(4 Suppl):277S-284S.

- (61) FDA United States Food and Drug Administration. www.fda.gov. internet . 2003.
- (62) Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci*. 1987;23(6):551-555.
- (63) Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991;15(3):175-191.
- (64) Turner CH. Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory. *Bone*. 1991;12(3):203-217.
- (65) Cerroni AM, Tomblinson GA, Turnquist JE, Gryn timer MD; *Am J Phys Anthropol*. 2000 Nov; 113(3):389-410
- (66) Bellino FL, Wise PM. Nonhuman primate models of menopause workshop. *Biol Reprod*. 2003;68(1):10-18.
- (67) Huang RY, Miller LM, Carlson CS, Chance MR. Characterization of bone mineral composition in the proximal tibia of cynomolgus monkeys: effect of ovariectomy and nandrolone decanoate treatment. *Bone*. 2002;30(3):492-497.
- (68) Itoh F, Kojima M, Furihata-Komatsu H et al. Reductions in bone mass, structure, and strength in axial and appendicular skeletons associated with increased turnover after ovariectomy in mature cynomolgus monkeys and preventive effects of clodronate. *J Bone Miner Res*. 2002;17(3):534-543.
- (69) Jerome CP. Primate models of osteoporosis. *Lab Anim Sci*. 1998;48(6):618-622.
- (70) Cerroni AM, Tomlinson GA, Turnquist JE, Gryn timer MD. Effect of parity on bone mineral density in female rhesus macaques from Cayo Santiago. *Am J Phys Anthropol*. 2003;121(3):252-269.
- (71) Hodgen GD, Goodman AL, O'Connor A, Johnson DK. Menopause in rhesus monkeys: model for study of disorders in the human climacteric. *Am J Obstet Gynecol*. 1977;127(6):581-584.
- (72) Miller LC, Weaver DS, McAlister JA, Koritnik DR. Effects of ovariectomy on vertebral trabecular bone in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Calcif Tissue Int*. 1986;38(1):62-65.

- (73) Mann DR, Gould KG, Collins DC. A potential primate model for bone loss resulting from medical oophorectomy or menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(1):105-110.
- (74) Jerome CP, Carlson CS, Register TC et al. Bone functional changes in intact, ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. *J Bone Miner Res.* 1994;9(4):527-540.
- (75) Boyce RW, Franks AF, Jankowsky ML et al. Sequential histomorphometric changes in cancellous bone from ovariectomized dogs. *J Bone Miner Res.* 1990;5(9):947-953.
- (76) Faugere MC, Friedler RM, Fanti P, Malluche HH. Bone changes occurring early after cessation of ovarian function in beagle dogs: a histomorphometric study employing sequential biopsies. *J Bone Miner Res.* 1990;5(3):263-272.
- (77) Malluche HH, Faugere MC, Rush M, Friedler R. Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental beagle dogs. *Endocrinology.* 1986;119(6):2649-2654.
- (78) Martin RB, Butcher RL, Sherwood LL et al. Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone.* 1987;8(1):23-31.
- (79) Monier-Faugere MC, Friedler RM, Bauss F, Malluche HH. A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs. *J Bone Miner Res.* 1993;8(11):1345-1355.
- (80) Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology.* 2001;142(8):3546-3553.
- (81) Delany AM, Amling M, Priemel M et al. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;105(9):1325.
- (82) Ducy P, Amling M, Takeda S et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000;100(2):197-207.

- (83) Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone*. 1993;14(1):1-6.
- (84) Peng ZQ, Vaananen HK, Zhang HX, Tuukkanen J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone*. 1997;20(3):207-212.
- (85) Wronski T.J. and Yen C.F. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 18, 227-236. 1991.
- (86) Aerssens J, Van Audekercke R, Talalaj M et al. Effect of 1alpha-vitamin D3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. *Endocrinology*. 1996;137(4):1358-1364.
- (87) Birner H. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels bei der Ratte und beim Menschen, Vitamine als Prophylaxe im Osteoporosemodell Ratte. 1995.
- (88) Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J, Interspecies differences in bone composition, density and quality, potential implications for in vivo bone research, *Endocrinology* 1998 Feb, 139(2):663-70;
- (89) Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA et al. Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone*. 1993;14(3):379-382.
- (90) Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.
- (91) Newmann E, Turner AS, Wark JD The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models, *Bone* 1995, Apr. 16(4 Suppl):277S-283S
- (92) Lill C, Fluegel AK, Schneider E. Sheep model for fracture treatment in osteoporotic bone: A pilot study about different induction regimens. *J Orthop Trauma*. 2000;14(8):559-566.
- (93) Amling M, Schilling AF, Haberland M, Rueger JM. [Leptin: factor in the central nervous system regulation of bone mass. Development of a new

- understanding of bone remodelling, skeletal reconstruction, skeletal preservation and skeletal repair]. *Orthopade*. 2001;30(7):418-424.
- (94) Clarke IJ, Henry B, Iqbal J, Goding JW. Leptin and the regulation of food intake and the neuroendocrine axis in sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(1-2):106-107.
- (95) Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem*. 2002;85(4):825-836.
- (96) Haberland M, Schilling AF, Rueger JM, Amling M. Brain and bone: central regulation of bone mass. A new paradigm in skeletal biology. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(12):1871-1876.
- (97) Karsenty G. Central control of bone formation. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 2001;31:119-133.
- (98) Karsenty G. Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:401-415.
- (99) Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111(3):305-317.
- (100) Haberland M, Schilling AF, Rueger JM, Amling M. Brain and bone: central regulation of bone mass. A new paradigm in skeletal biology. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(12):1871-1876.
- (101) R & D Systems. Leptin/ OB. 1997.
- (102) Henry BA, Goding JW, Alexander WS et al. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology*. 1999;140(3):1175-1182.
- (103) Henry BA, Goding JW, Tilbrook AJ et al. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without

- affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. *J Endocrinol.* 2001;168(1):67-77.
- (104) Morrison CD, Daniel JA, Holmberg BJ et al. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J Endocrinol.* 2001;168(2):317-324.
- (105) Thomas T, Burguera B. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Miner Res.* 2002;17(9):1563-1569.
- (106) Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002;2(4):389-406.
- (107) Hagiwara S, Yang SO, Gluer CC et al. Noninvasive bone mineral density measurement in the evaluation of osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1994;20(3):651-669.
- (108) Bone densitometry. *Med Lett Drugs Ther.* 1996;38(988):103-104.
- (109) Grütter R., Cordey J., Koller B., Wahl D.: Torsional strength of human cadaver tibiae: The size is more important than the degree of osteoporosis, Book of abstracts 10th Conference of the European Society of Biomechanics, Leuven, August: 28-31
- (110) Ruegsegger, Quantitative computed tomography at peripheral measuring sites. *Ann. Chir. Gynaecol.* 77:204-207
- (111) Natali AN, Meroi EA (1989): A review of the biomechanical properties of bone as a material, *J Biomed Eng* 11:266-284
- (112) Bouxsein ML, Myers ER, Hayes WC: Biomechanics of Age-Related Fractures, *Osteoporosis, Academic Press. Inc.*, 373-393
- (113) Borchers RE, Gibson JL, Burchardt H, Hayes WC: Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone, 1995 *Biomaterial* 16:545-551
- (114) Deloffre P, Hans D, Rumelhart C, Mitton D: Comparison between bone density and bone strength in glucocorticoid-treated aged ewes, 1995 *Bone* Vol.17 (suppl4):409-414

(115)Gerlach UV, Osteoporose beim Schaf: Tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Frakturbehandlung beim osteoporotischen Knochen, Bonn 2002

7. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria, Arterie
a.p.	anterior-posterior
art. CSF Flüssigkeit	artificial cerebrospinal fluid, artifizielle cerebrospinale
BMC	bone mineral content (Knochenmineralgehalt)
BMD	bone mineral density (Knochenmineraldichte)
DEXA	dual energy X-ray absorptiometry (duale Röntgenabsorptiometrie)
icv	intracerebroventriculär
i.m.	intra muskulär
i.v.	intra venös
L6	6. Lendenwirbel
LV	lateral Ventrikel
LV m	lateral Ventrikel modifiziert
3V	dritter Ventrikel
OB	Leptin (Produkt vom ob-Gen)
ob-Gen	Obesitas-Gen
OP	Operation/-s
ovx	Ovariectomie, ovariectomiert
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
V.	Vena, Vene
WHO	World Health Organisation (Welt Gesundheitsorganisation)

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb.1 normaler Knochen vs. Osteoporotischer Knochen	9
Abb. 2 Einfluss von Leptin auf den Körper	19
Tab. 1 Einteilung der Schafe in Gruppen	23
Abb. 3 Ovariectomie eines Versuchsschafes	25
Abb. 4 freipräparierte Kalotte	27
Abb. 5 Einbringen des „needle guide“	28
Abb. 6 Röntgenbild zur Kontrolle der Platzierung der Kanüle im 3. Ventrikel	29
Abb. 7 Kalotte mit monokrylen Schrauben, Acrylat und Kanüle	30
Abb. 8 Schafe nach der Operation im Freilauf	31
Abb. 9 Rucksacksystem zur kontinuierlichen Gabe von Leptin/ art. CSF	33
Abb. 10 DEXA Messung Versuchsschaf	35
Abb. 11 Biopsie aus L6	37
Abb. 12 Kompressionstest der L6	38
Abb. 13 Kraft-Weg- Kurve L6	38
Abb. 14 Vier-Punkt-Biegung der Tibiae	39
Abb. 15 Kraft-Biegungs-Kurve Tibiae	39
Abb. 16 Torsionstest Tibia	40
Abb. 17 Drehmoment- Winkel-Kurve Tibia	40
Abb. 18 Körpergewicht Kontrollgruppe	42
Abb. 19 Körpergewicht Leptingruppen 2 und 3	42
Abb. 20 Körpergewicht art. CSF Gruppe	43
Abb. 21 DEXA Messung Kontrollgruppe	44
Abb. 22 DEXA Messung Leptingruppen 2 und 3	44

Abb. 23 DEXA Messung art. CSF Gruppe	45
Tab. 2 Knochenmineraldichtemessung L6	46
Abb. 24 Knochenmineraldichtemessung L6	46
Tab. 3 Knochenmineraldichtemessung Tibia	47
Abb. 25 Knochenmineraldichtemessung Tibia	47
Tab. 4 Steifigkeit Spongiosaproben L6	48
Abb. 26 Steifigkeit Spongiosaproben L6	48
Tab. 5 Drucklastmessung Spongiosaprobe L6	49
Abb. 27 Drucklastmessung Spongiosaprobe L6	49
Tab. 6 Steifigkeitsmessung Tibia in a.p.	50
Abb. 28 Steifigkeitsmessung Tibia in a.p.	50
Tab. 7 Steifigkeitsmessung Tibia in l.m.	51
Abb. 29 Steifigkeitsmessung Tibia in l.m.	51
Tab. 8 Torsionssteifigkeit Tibia	52
Abb. 30 Torsionssteifigkeit Tibia	52
Tab. 9 maximales Moment Tibia	53
Abb. 31 maximales Moment Tibia	53
Abb. 32 Korrelation Knochenmineraldichte – maximale Kraft L6	54

9. Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mir bei der Durchführung der Dissertation behilflich waren:

Die vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne Dr. Marcus Egermann. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas und die Zusammenarbeit beim praktischen Teil der Arbeit in Davos. Mein besonderer Dank vor allem für die aussergewöhnliche Unterstützung in theoretischen Fragen und das geduldige Korrigieren aller Vorabversionen.

Ich danke Herrn Professor Dr. Joerg Auer für die Übernahme und Betreuung meiner Dissertation. Vielen Dank für die Geduld und wertvollen Kommentare während des Korrekturlesens.

Bei Herrn Prof. Dr. Erich Schneider möchte ich mich für die Möglichkeit am AO Forschungsinstitut in Davos zu arbeiten und für die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich bedanken.

Ich moechte mich ganz herzlich bei Boyko Guergouiev für seine Unterstützung bei den praktischen Versuchen bedanken und seine kompetente Hilfe bei der Analyse der Daten.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihre Gelduld und ihre Unterstützung während meiner Ausbildung.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön gewidmet, die nicht namentlich genannt wurden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

10. Lebenslauf

Name: Susanne Christina Tröster

Geburtsdatum: 09.08.1975

Geburtsort: Hirschau

Nationalität: deutsch

Heimatort: Hirschau

1982 – 1986 Volksschule Hirschau

1986 – 1995 Dr. Johanna Decker Gymnasium Amberg

1995 Abitur

1997 – 2000 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig

2000 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Austauschsemester)

2001 – 2003 Abschlussprüfung an der Universität Leipzig, Deutschland

2003 –2004 Doktorandin, AO Research Insitute, Davos, Schweiz

2004-2005 Internship, Equine Referral Hospital, Royal Veterinary College, England

seit 2005 Tierärztin, Hongkong Jockey Club, Hongkong

07.01.2007